

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE



MILENA KALEGARI



**ABORDAGEM FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA,
ANTIMICROBIANA E TOXICOLÓGICA DE *Rourea induta* PLANCH.
(CONNARACEAE)**

CURITIBA

2014

MILENA KALEGARI

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA,
ANTIMICROBIANA E TOXICOLÓGICA DE *Rourea induta* PLANCH.
(CONNARACEAE)**

Tese apresentada em co-tutela entre a Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da, e o Museum National d'Histoire Naturelle, Ecole Doctorale Sciences de La Nature et de l'Homme, como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas (UFPR) e Doutora em Química (MNHN).

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Dr. Didier Stien

CURITIBA

2014

Kalegari, Milena

Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica, antimicrobiana e toxicológica de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) / Milena Kalegari – Curitiba, 2014.

207f.: il.; 30 cm.

Orientadores: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel e Dr. Didier Stien

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, em co-tutela com o Museum National d'Histoire Naturelle, Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de L'Homme, 2014.

Referências bibliográficas: f. 190-201

1. *Rourea induta*. 2. Anti-inflamatório. 3. Hepatoproteção. 4. Toxicidade. 5. Antimicrobianos. - Tese. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Stien, Didier. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.721


TERMO DE APROVAÇÃO

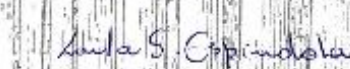
MILENA KALEGARI


Título: **Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica, antimicrobiana e toxicológica de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae)**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



Prof. Dr. Abdullo Gomes Miguel
Orientador


Prof. Dr. Didier Stien
Institut de Chimie de Substances Naturelles – Gif-sur-Yvette, França


Prof. Dr. Laila Salmen Espindola
Universidade de Brasília


Prof. Dr. Jorge Alberto López Rodriguez
Universidade Tiradentes


Prof. Dr. Yanna Dantas Rattmann
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz
Universidade do Vale do Itajaí

Curitiba, 28 de março de 2014.

**Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade
(Raul Seixas)**

AGRADECIMENTOS

*À **Universidade Federal do Paraná** e ao **Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela oportunidade de realização deste trabalho.*

*À **CAPES** pelo apoio financeiro com as bolsas Reuni e PDEE.*

*Ao **Museum National d'Histoire Naturelle** de Paris pela oportunidade de realizar a dupla diplomação.*

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel** pela confiança no meu trabalho, seus ensinamentos, dedicação e amizade durante todos esses anos.*

*Ao meu orientador **Dr. Didier Stien** por me receber no Institut de Chimie de Substances Naturelles (ICSN), na França. Obrigada por seus ensinamentos, por dedicar seu tempo, por sua confiança e pela sua amizade.*

*Ao **Prof. Dr. Mário Steindel** e a mestrandia **Celina**, do Laboratório de Protozoologia da UFSC, pela colaboração nos testes antiparasitários.*

*Ao **Gabriel**, doutorando da UFRN, à **Profa. Dra. Maria das Graças Almeida**, sua orientadora, ao **Prof. Dr. Jorge A. López**, e à doutora **Naira**, pela realização do teste antioxidante e hepatoprotetor *in vivo*.*

*Ao **Prof. Dr. Adair R. S. dos Santos**, do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação da UFSC, e aos amigos deste laboratório **Murilo, Serginho, Marina, Deise, Fran**, e todos que por lá estavam, pela realização dos testes antinociceptivos e anti-inflamatórios *in vivo*. Obrigada por me acolherem e dedicarem seu tempo na realização deste trabalho.*

*À **Profa. Dra. Patrícia Stuelp Campelo**, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, e às alunas **Camila** e **Priscila** pela realização dos testes de toxicidade aguda *in vivo*.*

Às **Profas. Marilis, Josiane e Sandra Zanin** pela amizade e ensinamentos.

Ao **Dr. Jean-Claude Drapier**, à **Sylvie e Cendrine** do ICSN pela oportunidade de realização dos testes anti-inflamatórios *in vitro*.

Aos **colegas e amigos do ICSN** que me receberam de braços abertos para uma nova etapa deste trabalho. À equipe 09, Véronique, Charlote, Thiago, Mayka, Hugues e Caroline, à equipe do HPLC, equipe do RMN, e à amiga Alice, obrigada pela amizade e carinho de todos.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Farmacotécnica da UFPR pela amizade e companheirismo durante esta jornada, em especial à **Cris Paula, Bia, Cris Mayumi, Vinícius, Daniella, Fernanda, Maria Christina e Ranieri**.

Aos demais colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio.

À minha família, em especial aos meus pais, **Dilma e José**, e irmãos, **Diego e Paloma**, por todo apoio, dedicação, compreensão, colo, incentivo e amor. O apoio de vocês foi fundamental.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A **Deus** pela minha vida.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	12
	LISTA DE GRÁFICOS	18
	LISTA DE TABELAS	20
	LISTA DE SIGLAS	22
	RESUMO	24
	ABSTRACT	26
	RESUME	28
1	INTRODUÇÃO	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1	FAMÍLIA CONNARACEAE	33
3.1.1	Aspectos Gerais	33
3.1.1.1	<i>Rourea induta</i> Planch	34
3.1.2	Dados Farmacológicos da Família	36
3.2	DOR E INFLAMAÇÃO	37
3.2.1	Mediadores Inflamatórios	39
3.3	ESTRESSE OXIDATIVO	40
3.4	FLAVONOIDES: ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIOS	41
3.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	43
3.5.1	Atividade Antifúngica e Antibacteriana	43
3.5.2	Doenças Parasitárias.....	44
3.5.2.1	Leishmanioses.....	44
3.5.2.2	Tripanossomíase	45

4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	MATERIAL BOTÂNICO	47
4.1.1	Determinação de Umidade	47
4.1.2	Determinação de Cinzas Totais.....	47
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	48
4.2.1	Filtração em Membrana de Poliamida	48
4.2.2	Determinação do Teor de Sólidos	48
4.2.3	Fluxograma de Obtenção dos Extratos e Frações.....	49
4.3	ISOLAMENTO DE COMPOSTOS	50
4.3.1	Fração Acetato de Etila	50
4.3.2	Extrato Aquoso	52
4.3.3	Fração Clorofórmio	52
4.4	IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....	53
4.4.1	Síntese e Derivatização de Derivados do Ácido Quínico.....	54
4.5	DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES.....	55
4.6	ANÁLISES FARMACOLÓGICAS	55
4.6.1	Animais.....	55
4.6.2	Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Formalina	56
4.6.3	Avaliação do Envolvimento do Sistema Opióide	57
4.6.4	Modelo de Dor Inflamatória Crônica Induzida pelo Adjuvante Completo de Freund	57
4.6.4.1	Quantificação de citocinas pró-inflamatórias	58
4.6.5	Avaliação de Dor Induzida por Citocinas	59
4.6.6	Avaliação da Atividade Locomotora e Temperatura Corporal	59
4.6.7	Determinação da Capacidade Antioxidante <i>in vivo</i>	59
4.6.7.1	Coleta e processamento das amostras	60
4.6.7.2	Avaliação bioquímica.....	60
4.6.7.3	Homogenato do fígado	60

4.6.7.4	Determinação da glutathiona reduzida (GSH)	61
4.6.7.5	Determinação da atividade da catalase (CAT)	61
4.6.7.6	Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	61
4.6.7.7	Determinação da atividade glutathiona peroxidase (GPx)	62
4.6.7.8	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT)	62
4.6.7.9	Avaliação histopatológica do fígado	62
4.6.8	Toxicidade Aguda	63
4.6.8.1	Análises bioquímicas	63
4.6.8.2	Análise histopatológica	64
4.7	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	64
4.7.1	Cultura e Viabilidade Celular	64
4.7.2	Verificação da Produção de Óxido Nítrico (NO)	64
4.7.3	Verificação da Produção de TNF- α	66
4.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	66
4.8.1	Triagem <i>in vitro</i> de Atividade Tripanocida e Leishmanicida	66
4.8.1.2	Citotoxicidade sobre células J774.A1	67
4.8.2	Atividade Antifúngica	67
4.8.2.1	Preparo do inóculo	68
4.8.2.2	Preparo do teste	68
4.8.3	Atividade Antibacteriana	69
4.8.3.1	Preparo do inóculo	69
4.8.3.2	Preparo do teste	69
4.9	CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	70
4.9.1	Citotoxicidade Sobre Células KB e MRC5	70
4.10	ATIVIDADE HEMOLÍTICA	71
4.10.1	Hemólise em Tubo	71
4.10.2	Hemólise por Difusão em Ágar Sangue	71

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	73
5.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES.....	73
5.3	ISOLAMENTO DE COMPOSTOS	74
5.3.1	Fração Acetato de Etila	74
5.3.2	Extrato Aquoso	76
5.3.3	Fração Clorofórmio Filtrada em Membrana de Poliamida	77
5.4	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	80
5.4.1	Compostos Isolados	80
5.4.2	Flavonoides	81
5.4.2.1	AC28-29	81
5.4.2.2	AC36-37-2	85
5.4.2.3	AC36-37-4	90
5.4.3	Proantocianidinas	95
5.4.3.1	AC30-33-1	95
5.4.3.2	EAS12-3	98
5.4.4	Derivados do Ácido Clorogênico.....	102
5.4.4.1	EAS7-2	102
5.4.4.2	EAS7-1	106
5.4.4.3	AC34-35-2	110
5.4.4.4	Determinação da configuração dos derivados do ácido clorogênico	115
5.4.5	Megastigmanos	117
5.4.5.1	CP1-1	117
5.4.5.2	CP1-2	123
5.4.5.3	CPF-1	127
5.4.5.4	CPF-2	134
5.4.5.5	CP1-3	137

5.5	DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES.....	143
5.5.1	Desenvolvimento do Método	143
5.5.2	Linearidade.....	145
5.5.3	Precisão.....	146
5.5.4	Robustez	146
5.5.5	Especificidade (Pureza).....	147
5.5.6	Quantificação do Extrato	147
5.6	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	150
5.6.1	Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Formalina	150
5.6.2	Avaliação do Envolvimento do Sistema Opióide	152
5.6.3	Modelo de Dor Inflamatória Crônica Induzida pelo Adjuvante Completo de Freund	153
5.6.3.1	Quantificação de citocinas.....	157
5.6.4	Dor Induzida por Citocinas	158
5.6.5	Teste do Campo Aberto e Temperatura Corporal	159
5.6.6	Determinação da Capacidade de Antioxidante <i>in vivo</i>	160
5.6.6.1	Parâmetros bioquímicos	160
5.6.6.2	Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo	161
5.6.6.3	Avaliação histopatológica do fígado	163
5.6.7	Toxicidade Aguda	165
5.6.7.1	Análises comportamentais e bioquímicas.....	165
5.6.7.2	Avaliação histopatológica	168
5.7	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	170
5.7.1	Viabilidade Celular.....	170
5.7.2	Produção de Óxido Nítrico.....	171
5.7.3	Avaliação da Produção de TNF- α	175
5.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	176
5.8.1	Triagem <i>in vitro</i> de Atividade Tripanocida e Leishmanicida.....	176

5.8.1.1	Viabilidade celular em cultura de células J774.A1	180
5.8.2	Atividade Antifúngica	181
5.8.3	Atividade Antibacteriana	182
5.9	CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	184
5.9.1	Citotoxicidade sobre Células KB e MRC5	184
5.10	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	185
5.10.1	Hemólise em Tubo.....	185
5.10.2	Hemólise por Difusão em Ágar Sangue.....	186
6	CONCLUSÃO	187
	REFERÊNCIAS	190
	ANEXOS	202

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Foto da espécie <i>Rourea induta</i> Planch	35
Figura 2	– Cromatograma de CLAE preparativa da fração AC30-33.	75
Figura 3	– Cromatograma de CLAE preparativa da fração AC34-35	75
Figura 4	– Cromatograma de CLAE analítica para purificação do composto AC34-35-2	75
Figura 5	– Cromatograma de CLAE preparativa da fração AC36-37	76
Figura 6	– Cromatograma de CLAE preparativa da fração EAS7	77
Figura 7	– Cromatograma de CLAE preparativa da fração EAS12	77
Figura 8	– Perfil em CLAE da fração clorofórmio	78
Figura 9	– Perfil em CLAE da fração clorofórmio filtrada em membrana de poliamida	78
Figura 10	– Cromatograma de CLAE preparativa da fração clorofórmio filtrada em membrana de poliamida	79
Figura 11	– Cromatograma de separação em CLAE analítica da fração CP1 ...	79
Figura 12	– Cromatograma de separação em CLAE preparativa da fração CPF	79
Figura 13	– Cromatograma de separação em CLAE analítica do pico coletado na fração CPF	80
Figura 14	– Espectro RMN- ¹³ C do composto AC28-29 em CD ₃ OD a 75,47 MHz e 25 °C.....	82
Figura 15	– Espectro RMN- ¹ H do composto AC28-29 em CD ₃ OD a 300 MHz e 25 °C.....	83
Figura 16	– Espectro de massa (ES+) de AC28-29	84
Figura 17	– Estrutura química da epicatequina.....	84

Figura 18 – Espectro de massa (ES-) do composto AC36-37-2	87
Figura 19 – Espectro HMBC do composto AC36-37-2 em CD ₃ OD	87
Figura 20 – Espectro RMN- ¹³ C do composto AC36-37-2 em CD ₃ OD a 125,76 MHz e 25 °C.....	88
Figura 21 – Espectro RMN- ¹³ C do composto AC36-37-2 em CD ₃ OD a 500 MHz e 25 °C.....	89
Figura 22 – Estrutura química da isoquercetina.....	90
Figura 23 – Espectro RMN- ¹³ C do composto AC36-37-4 em CD ₃ OD a 125,76 MHz e 25 °C.....	92
Figura 24 – Espectro RMN- ¹ H do composto AC36-37-4 em CD ₃ OD a 500 MHz e 25 °C	93
Figura 25 – Espectro HMBC do composto AC36-37-4.....	94
Figura 26 – Espectro de massa (ES-) do composto AC36-37-4	94
Figura 27 – Estrutura química da guaijaverina	94
Figura 28 – Espectro RMN- ¹ H de AC30-33-1 em CD ₃ OD a temperatura ambiente (25°C) a 500 MHz.....	96
Figura 29 – Espectro RMN- ¹ H de AC30-33-1 em CD ₃ OD a -30°C a 600 MHz ..	97
Figura 30 – Espectro de massa (ES-) de AC30-33-1	98
Figura 31 – Estrutura química da procianidina B2.....	98
Figura 32 – Espectro RMN- ¹ H de EAS12-3 em CD ₃ OD a temperatura ambiente (25°C) a 500 MHz.....	99
Figura 33 – Espectro de massa (ES-) de EAS12-3.....	100
Figura 34 – Espectro RMN- ¹ H de EAS12-3 em CD ₃ OD a -30°C a 600 MHz	101
Figura 35 – Estrutura química da procianidina C1	102
Figura 36 – Espectro RMN- ¹ H de EAS7-2 em CD ₃ OD a 500 MHz e 25 °C.....	104
Figura 37 – Espectro COSY de EAS7-2.....	105

Figura 38 – Espectro HSQC de EAS7-2	105
Figura 39 – Espectro HMBC de EAS7-2	105
Figura 40 – Espectro de massa (ES-) EAS7-2.....	106
Figura 41 – Cromatograma de co-injeção do ácido clorogênico comercial e EAS7-2	106
Figura 42 – Estrutura química do ácido clorogênico	106
Figura 43 – Cromatograma de co-injeção do ácido neoclorogênico e EAS7-1 ..	107
Figura 44 – Espectro COSY de EAS7-1.....	108
Figura 45 – Espectro HSQC de EAS7-1.....	108
Figura 46 – Espectro de massa (ES-) de EAS7-1.....	108
Figura 47 – Espectro RMN- ¹ H de EAS7-1 em CD ₃ OD a 500 MHz e 25 °C	109
Figura 48 – Estrutura química do ácido neoclorogênico	110
Figura 49 – Espectro COSY de AC34-35-2.....	112
Figura 50 – Espectro HSQC de AC34-35-2	112
Figura 51 – Espectro RMN- ¹ H de AC34-35-2 em CD ₃ OD a 600 MHz e 25 °C...	113
Figura 52 – Espectro HMBC de AC34-35-2	114
Figura 53 – Espectro NOESY de AC34-35-2	114
Figura 54 – Espectro de massa (ES-) AC34-35-2.....	114
Figura 55 – Estrutura química do éster metílico do ácido neoclorogênico	115
Figura 56 – Estrutura química da lactona triacetato	116
Figura 57 – Espectro de CG/MS do ácido químico comercial	116
Figura 58 – Expansão do cromatograma do íon 344,4 em CG/MS para os derivados do ácido clorogênico.....	116
Figura 59 – Espectro RMN- ¹ H de CP1-1 em CD ₃ OD a 600 MHz e 25 °C.....	119

Figura 60 – Espectro RMN- ¹³ C de CP1-1 em CD ₃ OD a 150,7 MHz e 25 °C.....	120
Figura 61 – Espectro COSY de CP1-1.....	121
Figura 62 – Espectro HSQC de CP1-1.....	121
Figura 63 – Espectro HMBC de CP1-1	121
Figura 64 – Espectro NOESY de CP1-1	122
Figura 65 – Dicroísmo circular de CP1-1	122
Figura 66 – Espectro de massa (ES+) de CP1-1	122
Figura 67 – Estrutura química do (6 <i>S</i> ,9 <i>S</i>) – roseosideo.....	123
Figura 68 – Dicroísmo circular de CP1-2	124
Figura 69 – Espectro de RMN- ¹ H de CP1-2 em CD ₃ OD a 600 MHz e 25 °C.....	125
Figura 70 – Espectro de RMN- ¹³ C de CP1-2 em CD ₃ OD a 150,7 MHz e 25 °C.	126
Figura 71 – Estrutura química do (6 <i>S</i> ,9 <i>R</i>) – roseosideo	127
Figura 72 – Espectro HSQC de CPF-1	129
Figura 73 – Espectro RMN- ¹³ C de CPF-1 em CD ₃ OD a 150,7 MHz e 25 °C	130
Figura 74 – Espectro RMN- ¹ H de CPF-1 em CD ₃ OD a 600 MHz e 25 °C.....	131
Figura 75 – Espectro COSY de CPF-1.....	132
Figura 76 – Espectro HMBC de CPF-1	132
Figura 77 – Espectro NOESY de CPF-1	133
Figura 78 – Dicroísmo circular de CPF-1	133
Figura 79 – Espectro de massa (ES+) de CPF-1	133
Figura 80 – Estrutura química do (6 <i>R</i> ,9 <i>R</i>) – byzantionosideo B	133
Figura 81 – Dicroísmo circular de CPF-2	134
Figura 82 – Espectro HSQC de CPF-2	135

Figura 83 – Espectro RMN- ¹ H de CPF-2 em CD ₃ OD a 600 MHz e 25 °C.....	136
Figura 84 – Estrutura química do (6 <i>R</i> ,9 <i>S</i>) – blumenol C glucosideo.....	137
Figura 85 – Espectro COSY de CP1-3.....	139
Figura 86 – Espectro RMN- ¹ H de CP1-3 em CD ₃ OD a 600 MHz e 25 °C.....	140
Figura 87 – Espectro RMN- ¹³ C de CP1-3 em CD ₃ OD a 150,7 MHz e 25 °C.....	141
Figura 88 – Espectro HSQC de CP1-3.....	141
Figura 89 – Espectro HMBC de CP1-3	142
Figura 90 – Espectro NOESY de CP1-3	142
Figura 91 – Espectro de massa (ES+) de CP1-3	142
Figura 92 – Espectro RMN- ¹ H na piridina-d ₆ do composto CP1-3 a 500 MHz ...	143
Figura 93 – Estrutura química do citrosideo A	143
Figura 94 – Cromatograma de CLAE do extrato bruto etanólico de <i>Rourea induta</i>	144
Figura 95 – Cromatograma de CLAE de co-injeção do extrato bruto etanólico e hiperina	144
Figura 96 – Curva de calibração da hiperina para validação do método de quantificação de flavonoides em CLAE	145
Figura 97 – Pureza de pico de hiperina analisado em CLAE para validação do método de quantificação flavonoides.....	147
Figura 98 – Cromatograma de CLAE do extrato bruto etanólico de <i>Rourea induta</i> no método de quantificação de flavonoides	148
Figura 99 – Cromatograma de CLAE do extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> no método de quantificação de flavonoides.....	148
Figura 100 - Fotomicrografias representativas das secções do fígado dos ratos coradas com hematoxilina-eosina para avaliação do efeito hepatoprotetor do extrato etanólico de <i>Rourea induta</i>	164

Figura 101 - Avaliação histológica do efeito da administração aguda dos extratos de <i>Rourea induta</i> (2000 mg/kg, v.o.) no fígado e nos rins de camundongos	169
Figura 102 - Atividade hemolítica da fração clorofórmio.....	186

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da administração aguda do extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> (10 - 300 mg/kg, v.o.) e do composto hiperina (1-100 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.....	151
Gráfico 2 – Avaliação do envolvimento do sistema opióide como mecanismo de ação antinociceptiva do extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> (100 mg/kg, v.o.) no teste de nocicepção induzida pela formalina	153
Gráfico 3 – Efeito da administração aguda do extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> (100 mg/kg, v.o.) na hipersensibilidade mecânica induzida pelo CFA	154
Gráfico 4 – Efeito da administração crônica do extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> (100 mg/kg, v.o.) por 10 dias na hipersensibilidade mecânica induzida pelo CFA.....	155
Gráfico 5 – Curso temporal do extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> (100 mg/kg, v.o.) no 5º dia de tratamento na hipersensibilidade mecânica induzida pelo CFA.....	155
Gráfico 6 – Efeito da administração crônica por 10 dias do extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> (100 mg/kg, v.o.) na quantidade de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo CFA na pata e medula espinhal de camundongos.....	158
Gráfico 7 – Efeito da administração aguda do extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> (100 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por TNF- α e IL-1 β em camundongos.....	159
Gráfico 8 – Efeitos não específicos da administração aguda em camundongos do extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> em diferentes doses	160
Gráfico 9 – Viabilidade celular de células RAW264.7 para os extratos, frações (100 μ g/mL) e compostos isolados (50 μ g/mL) de <i>Rourea induta</i> com 18 h de incubação	171
Gráfico 10– Perfil da produção de nitrito por células RAW264.7 na presença dos extratos e frações de <i>Rourea induta</i> e 16 h de estimulação LPS	172

Gráfico 11– Porcentagem de inibição da produção de nitrito pelas células RAW264.7 na presença dos extratos e frações de <i>Rourea induta</i> (100 µg/mL) com 16 h de estimulação LPS e LPS+IFγ.....	173
Gráfico 12– Porcentagem de inibição da produção de nitrito pelas células RAW264.7 na presença de compostos isolados dos extratos de <i>Rourea induta</i> e 16 h de estimulação LPS.....	174
Gráfico 13– Perfil de produção de TNF-α por células RAW264.7 na presença dos extratos e frações de <i>Rourea induta</i> (100 µg/mL) e 16 h de estimulação LPS	175
Gráfico 14– Porcentagem de inibição da produção de TNF-α de células RAW264.7 na presença dos extratos e frações de <i>Rourea induta</i> (100 µg/mL) e estimulação LPS.....	176
Gráfico 15– Porcentagem de inibição de <i>Leishmania braziliensis</i> pelos extratos e frações de <i>Rourea induta</i> (1000 µg/mL e 500 µg/mL)	178
Gráfico 16– Porcentagem de inibição de <i>Trypanossoma cruzi</i> pelos extratos de <i>Rourea induta</i> (1000 µg/mL)	179
Gráfico 17– Viabilidade celular de células J774.A1 na presença dos extratos e frações de <i>Rourea induta</i> (1000 µg/mL).....	181

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente de solventes para fracionamento da fração acetato de etila.....	51
Tabela 2 – Gradiente de solventes para fracionamento do extrato aquoso	52
Tabela 3 – Método para doseamento de flavonoides do extrato de <i>Rourea induta</i>	55
Tabela 4 – Rendimento do extrato etanólico.....	73
Tabela 5 – Relação dos compostos isolados de <i>Rourea induta</i>	80
Tabela 6 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H E RMN- ¹³ C do composto AC28-29.....	81
Tabela 7 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do composto AC36-37-2	86
Tabela 8 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do composto AC36-37-4	91
Tabela 9 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H do composto AC30-33-1	96
Tabela 10 - Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H do composto EAS12-3.....	100
Tabela 11 - Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H do composto EAS7-2	103
Tabela 12 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H do composto EAS7-1	107
Tabela 13 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H do composto AC34-35-2	111
Tabela 14 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do composto CP1-1	118
Tabela 15 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do composto CP1-2	124
Tabela 16 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do composto CPF-1	129

Tabela 17 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do composto CPF-2	135
Tabela 18 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do composto CP1-3	139
Tabela 19 – Análise de precisão do método de doseamento em CLAE	146
Tabela 20 – Avaliação da robustez do método de quantificação dos flavonoides em CLAE	147
Tabela 21 – Doseamento de flavonoides no extrato etanólico e extrato aquoso de <i>Rourea induta</i>	149
Tabela 22 – Doseamento de flavonoides nas frações do extrato etanólico de <i>Rourea induta</i>	149
Tabela 23 – Efeito do extrato etanólico de <i>Rourea induta</i> nos níveis de amino transferases e bilirrubina total	161
Tabela 24 – Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Rourea induta</i> nos marcadores de estresse oxidativo (CAT, GPx, SOD e GSH).....	163
Tabela 25 – Perfil bioquímico dos animais tratados por via oral com extrato etanólico de <i>Rourea induta</i> após 14 dias	164
Tabela 26 – Perfil bioquímico dos animais tratados por via oral com extrato aquoso de <i>Rourea induta</i> após 14 dias.....	167
Tabela 27 – Atividade tripanocida e leishmanicida dos extratos de <i>Rourea induta</i>	177
Tabela 28 – Porcentagem de inibição das linhagens de <i>T. cruzi</i> e <i>L. braziliensis</i> na presença dos extratos de <i>Rourea induta</i>	178
Tabela 29 – Citotoxicidade sobre células J774.A1 e índice de seletividade dos extratos de <i>Rourea induta</i>	180
Tabela 30 – Atividade antifúngica dos extratos e frações de <i>Rourea induta</i>	181
Tabela 31 – Atividade antibacteriana dos extratos e frações de <i>Rourea induta</i> .	183
Tabela 32 – Citotoxicidade dos extratos e frações de <i>Rourea induta</i> sobre células KB e MRC5	184

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	– Alanina Aminotransferase
AST	– Aspartato Aminotransferase
ATCC	– American Type Culture Collection
BT	– Bilirrubina Total
CAT	– Catalase
CCD	– Cromatografia em Camada Delgada
CG/MS	– Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CIM	– Concentração Inibitória Mínima
CFA	– Adjuvante Completo de Freud
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	– Correlation Spectroscopy
DAD	– Detector diodo
DEDL	– Detector Evaporativo à Difusão da Luz
DTNB	– Reagente de Ellman - 5-5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico)
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	– Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	– Glutathione Peroxidase
GSH	– Glutathione Reduzida
HSQC	– Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	– Heteronuclear Multiple Bond Correlation
Hz	– Hertz
IL-1 β	– Interleucina 1 β
IF- γ	– Interferon gama
LPS	– Lipopolissacarídeo
MHz	– Mega Hertz
MSTFA	– N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
MTT	– brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium
MTS	– brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
NOESY	– Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

RDC	– Resolução de Diretoria Colegiada
RMN- ¹³ C	– Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
RMN- ¹ H	– Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SOD	– Superóxido Dismutase
SRAT	– Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBA	– Ácido Tiobarbitúrico
TCA	– Ácido Tricloroacético
THF	– Tetraidrofurano
TNF- α	– Fator de Necrose Tumoral α
<i>s</i>	– Singleto
<i>s/</i>	– Singleto Largo
<i>d</i>	– Dubleto
<i>dd</i>	– Duplo Dubleto
<i>t</i>	– Tripleto
<i>m</i>	– Multiplete
<i>J</i>	– Constante de Acoplamento

RESUMO

A espécie *Rourea induta* Planch. (Connaraceae), popularmente conhecida como campeira, chapeudinha ou pau-de-porco, possui poucos estudos registrados na literatura, mas espécies da mesma família apresentam atividades farmacológicas interessantes. O objetivo deste estudo foi avaliar as características fitoquímicas, verificar as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antiparasitária, antifúngica, antibacteriana e a toxicidade dos extratos e frações provenientes das folhas de *Rourea induta*. Foram isolados e identificados treze compostos, da fração acetato de etila: epicatequina, guaijaverina, isoquercetrina, ácido 5-O-cafeoilquínico metil éster e procianidina B2; do extrato aquoso: procianidina C1, ácido clorogênico e ácido neoclorogênico; e da fração clorofórmio filtrada em poliamida: (6S,9S)-roseosideo, (6S,9R)-roseosideo, citrosideo A, byzantionosideo B e blumenol C glucosideo. Foi desenvolvido e validado um método em CLAE para quantificação do composto marcador do extrato, a hiperina, isolada e identificada previamente. A atividade antinociceptiva foi avaliada *in vivo* pelo teste da formalina, através do qual o extrato aquoso (100 mg/kg; v.o.) apresentou inibição das duas fases do teste, demonstrando atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. No teste de hipersensibilidade mecânica (CFA 70%), o extrato aquoso (100 mg/kg; v.o.) apresentou redução da hipersensibilidade e efeito anti-inflamatório pela redução das citocinas TNF- α e IL-1 β na pata e medula dos camundongos, o qual foi capaz também de inibir a nocicepção causada pelo TNF- α em injeção intratecal. O sistema opióide não está envolvido no mecanismo de ação antinociceptivo do extrato aquoso. O potencial antioxidante e a capacidade de hepatoproteção foi avaliada com o extrato etanólico (500 mg/kg; v.o. 7 dias) pela capacidade de seqüestro de radicais livres (SRL) e atividade hepatoprotetora em ratos com lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). O extrato etanólico apresentou ação protetora contra lesões hepáticas induzido por CCl₄ evidenciado pela redução significativa nas atividades de enzimas séricas marcadoras de lesão hepática (ALT e AST). O extrato restaurou ainda o desequilíbrio induzido pelo CCl₄, evidenciado pela redução da peroxidação lipídica (SRAT), o aumento do conteúdo de glutathiona e do sistema enzimático de defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx) para valores próximos aos normais. A ação hepatoprotetora foi confirmada pela análise histológica do fígado. Na avaliação de toxicidade aguda em camundongos os extratos etanólico e aquoso apresentaram sinais brandos de toxicidade renal e hepática nas maiores doses (300 e 2000; mg/kg v.o.) quando administrados em dose única. A atividade anti-inflamatória *in vitro*, avaliada pela produção de óxido nítrico por células RAW264.7, foi demonstrada pela fração clorofórmio e clorofórmio filtrada em poliamida (100 μ g/mL) (50% de inibição) e por três glicosídeos isolados, (6S,9S)-roseosideo, byzantionosideo e blumenol C glucosideo (30% de inibição) (50 μ g/mL). A produção de TNF- α por essas células foi inibida pelo extrato aquoso filtrado em poliamida, extrato etanólico filtrado em poliamida e fração acetato de etila filtrado em poliamida (100 μ g/mL) com 5h de estimulação LPS. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela concentração inibitória mínima. Para atividade leishmanicida e tripanocida todas as amostras testadas foram inativas. No teste antifúngico a fração acetato de etila (CIM = 64 μ g/mL), hexano (CIM = 256 μ g/mL) e clorofórmio (CIM = 256 μ g/mL) apresentaram atividade contra *C. albicans*, e as duas primeiras foram ativas também contra *C. parapsilosis* (CIM = 16 e 64 μ g/mL respectivamente). Os extratos brutos

aquoso e etanólico apresentaram atividade contra bactérias Gram positivas, *S. aureus* (CIM = 39 e 78 µg/mL respectivamente) e *E. faecalis* (CIM = 78 µg/mL), e uma baixa atividade contra bactérias Gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*. A fração acetato de etila apresentou atividade contra os dois tipos de bactérias. Nenhuma amostra apresentou citotoxicidade contra células KB e MRC5, nem atividade hemolítica, portanto não são tóxicas nesses métodos. Os resultados encontrados incentivam a continuação da pesquisa com os extratos das folhas de *R. induta*, pois esses podem ser considerados promissores na busca e desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: *Rourea induta*, anti-inflamatório, hepatoproteção, toxicidade, antimicrobianos.

ABSTRACT

The species *Rourea induta* Planch., (Connaraceae), popularly known as campeira, chapeudinha or pau-de-porco, has few studies reported in the literature, but many species in this family have interesting pharmacological activities described. The aim of this study was evaluate the phytochemical characteristics, the antinociceptive, anti-inflammatory, antiparasitic, antifungal, antibacterial and toxicity of extracts and fractions from the leaves from *Rourea induta*. Were isolated and identified thirteen compounds, from the ethyl acetate fraction: epicatechin, guaijaverine, isoquercetrine, 5-O-caffeoylquinic acid methyl ester and procyanidin B2; from aqueous extract: procyanidin C1, chlorogenic acid, and neochlorogenic acid; and from chloroform fraction filtered in polyamide: (6S,9S)-roseoside, (6S,9R)-roseoside, citroside A, byzantionoside B and blumenol C glucoside. An HPLC method for the extract marker compound quantification, the hyperin, isolated and identified previously, was developed and validated. The antinociceptive activity was evaluated *in vivo* by the formalin injection test, whereby the aqueous extract (100 mg/kg; p.o.) showed inhibition in both phases, showing antinociceptive and antiinflammatory activity. In mechanical allodynia evaluation (70% CFA), the aqueous extract (100 mg/kg; p.o.) showed reduction of allodynia and showed anti-inflammatory effect by reducing cytokines TNF- α and IL-1 β in mice paw and spinal cord, which was also able to reduce the nociception caused by TNF- α intrathecal injection. The opioid system is not involved as the antinociceptive mechanism of aqueous extract action. The antioxidant potential and the liver protection potential were evaluated with the ethanol extract (500 mg/kg; p.o. 7 days) in rats with carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury. The ethanolic extract showed a protective action against liver injury evidenced by significant decrease of liver injury serum enzymes markers (ALT and AST). The extract also restored the imbalance induced by CCl₄ as evidenced by the decrease in lipid peroxidation (TBARS), the increase of glutathione content and antioxidant defense system enzyme (SOD, CAT, GPx) to values close to normal. The hepatoprotective effect was confirmed by liver histological analysis. For acute toxicity evaluation in mice, ethanolic and aqueous extracts showed mild signs of kidney and liver toxicity in highest doses (300 and 2000 mg/kg p.o.) when administered as a single dose. *In vitro* anti-inflammatory activity, evaluated by RAW264.7 cells nitric oxide production, was demonstrated by chloroform fraction and polyamide-filtered chloroform fraction (100 μ g/mL) (50% inhibition), and the three isolated glycosides (6S,9S)-roseoside, byzantionoside B and blumenol C glucoside (30% inhibition) (50 μ g/mL). TNF- α production by these cells was inhibited by polyamide-filtered aqueous extract, polyamide-filtered ethanol extract and polyamide-filtered ethyl acetate fraction (100 μ g/mL) with 5h of LPS stimulation. Antimicrobial activity was evaluated by minimum inhibitory concentration. The samples tested showed no activity towards *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi*. In the antifungal test, ethyl acetate (MIC = 64 μ g/mL), hexane (MIC = 256 μ g/mL) and chloroform (MIC = 256 μ g/mL) fractions showed activity against *C. albicans*, and the first two were also active against *C. parapsilosis* (MIC = 16 and 64 μ g/mL respectively). Aqueous and ethanolic extracts showed activity against the Gram positive bacteria *S. aureus* (MIC = 39 and 78 μ g/mL respectively) and *E. faecalis* (78 μ g/mL), and reduced activity against the Gram-negative bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa*. Ethyl acetate fraction showed

activity against both types of bacteria. No sample was cytotoxic against KB and MRC5 cells. No hemolytic activity was recorded either, so these fractions do not seem to be toxic. These results encourage further research with *R. induta* leaf extracts and these extracts can be considered as promising in the context of new drugs research and development.

Keywords: *Rourea induta*, anti-inflammatory, hepatoprotection, toxicity, antimicrobial.

RESUME

L'espèce *Rourea induta* Planch., (Connaraceae), populairement connu comme *campeira*, *chapeudinha* –*pau-de-porco* n'a été que peu étudié dans la littérature alors même que des espèces de la même famille possèdent des activités pharmacologiques intéressantes. Le but de cette étude était d'évaluer les caractéristiques phytochimiques des extraits et fractions obtenus à partir des feuilles de cette plante et de vérifier leurs activités antinociceptive, anti-inflammatoire, anti-parasitaire, antifongique et antibactérienne ainsi que leur toxicité. Treize composés ont été isolés et identifiés ; de la fraction à l'acétate d'éthyle : épicatechine, guaijavérine, isoquercétrine, ester méthylique de l'acide 5-O-caféoylquinique et procyanidine B2 ; de l'extrait aqueux : procyanidine C1, acide néoclorogénique et acide chlorogénique ; et de la fraction chloroforme filtrée sur polyamide : (6S,9S)-roséoside, (6S,9R)-roséoside, citroside A, byzantionoside B et glucoside de bluménol C. Une méthode HPLC pour la quantification du composé marqueur de l'extraire, hyperine, précédemment isolé et identifié, a été développée et validée. L'activité antinociceptive a été évaluée *in vivo* par le test au formol, dans lequel l'extrait aqueux (100 mg/kg; v.o.) a inhibé les deux phases, démontrant une activité antinociceptive et anti-inflammatoire. Dans le test d'allodynie mécanique (CFA 70%), l'extrait aqueux (100 mg/kg ; v.o.) réduit l'allodynie et possède un effet anti-inflammatoire par réduction de la concentration en TNF- α et IL-1 β dans la patte et la moelle osseuse de souris. Il est également capable d'inhiber la nociception provoquée par le TNF- α en injection intrathécale. Le système opioïde n'est pas impliqué dans le mécanisme d'action antinociceptive de l'extrait aqueux. Les capacités antioxydante et hépatoprotectrice ont été évaluées avec l'extrait éthanolique (500 mg/kg ; v.o., 7 jours) chez des rats avec des lésions hépatiques induites par le tétrachlorure de carbone (CCl₄). L'extrait à l'éthanol a montré une action protectrice contre les blessures du foie induites par le CCl₄ comme en témoigne la réduction considérable des activités des enzymes marqueurs sériques de lésions hépatiques (ALT et AST). L'extrait restaure également le déséquilibre induit par le CCl₄. En effet, la peroxydation lipidique (TBARS) est réduite et la teneur en glutathion et les concentrations des enzymes impliquées dans le système de défense antioxydant (SOD, CAT, GPx) reviennent à des valeurs proches de la normale. L'activité hépatoprotectrice a été confirmée par l'analyse histologique du foie. Dans l'évaluation de la toxicité aiguë chez la souris, les extraits à l'éthanol et à l'eau administrés en une seule dose ont montré des signes de toxicité rénale et hépatique légère à des doses assez élevées (300 et 2000 μ g/kg ; v.o.). L'activité anti-inflammatoire *in vitro* évaluée par la production d'oxyde nitrique par les cellules RAW264.7 a été démontrée pour la fraction au chloroforme et celle au chloroforme filtrée sur résine de polyamide (50% d'inhibition à 100 μ g/ml). Les trois glycosides isolés [(6S,9S)-roséoside, byzantionoside et glucoside de bluménol C] sont également actifs dans ce même test (30 % d'inhibition à 50 μ g/ml). La production de TNF- α par les cellules est inhibée par les extraits aqueux, à l'éthanol et la fraction à l'acétate d'éthyle tous filtrés sur polyamide (100 μ g/ml avec 5h stimulation par le LPS). L'activité antimicrobienne a été évaluée par la mesure de la concentration minimale inhibitrice. Il n'y a pas de activité antileishmanienne et antitrypanosomale pour tous les échantillons testés. Les fractions à l'acétate d'éthyle (CIM = 64 μ g/ml), à l'hexane (CIM = 256 μ g/ml) et au chloroforme (CIM = 256 μ g/mL) sont actives contre *C. albicans*, et les deux premières sont également actives vis-à-vis de *C. parapsilosis* (respectivement CIM

=16 et 64 mg/mL). Les extraits aqueux et éthanolique ont montré une activité contre les bactéries à Gram positif *S. aureus* (respectivement CIM = 39 et 78 µg/mL) et *E. faecalis* (CIM = 78 µg/mL). L'activité est plus faible contre les bactéries à Gram négatif *E. coli* et *P. aeruginosa*. La fraction à l'acétate d'éthyle est active contre les deux types de bactéries. Aucun échantillon n'a présenté de cytotoxicité contre les cellules MRC5 et KB. D'éventuelles activités hémolytiques n'ont pas non plus été détectées. Par conséquent, il semble que les extraits évalués dans cette étude ne soient pas toxiques. Ces résultats sont encourageant et de ce fait, les feuilles de *R. induta* peuvent être considérées intéressantes dans le contexte la recherche et du développement de nouveaux médicaments.

Mots-clés : *Rourea induta*, anti-inflammatoire, hépatoprotection, toxicité, antimicrobiens.

1 INTRODUÇÃO

As plantas são organismos que produzem e armazenam uma grande diversidade de substâncias, entre metabólitos primários e secundários, em suas folhas, caules, raízes, flores, frutos e sementes. Muitas destas substâncias, em especial os chamados metabólitos secundários, tem sua produção aumentada especificamente em decorrência de algum tipo de estresse sofrido pela planta, como falta de algum nutriente específico ou ataque de fungos e insetos. Muitas delas são conhecidamente portadoras de algum tipo de atividade biológica, tendo, portanto, interesse comercial na área farmacêutica (SIMÕES *et al.*, 2007).

Durante alguns anos, com o desenvolvimento da química orgânica em especial da química sintética, o conhecimento de plantas medicinais foi colocado a margem, dando-se preferência aos fármacos sintéticos que durante muitos anos foram apontados como a grande promessa de cura e alívio dos males. No entanto, a partir do final dos anos 90 as plantas voltaram a ser tema central de pesquisas e o seu uso e interesse vem aumentando a cada ano (AÑEZ, 1999). Nos anos 80, a Organização Mundial da Saúde (OMS) promoveu a aceitação e a implantação, por parte das autoridades, das terapias tradicionais, enfatizando a investigação e prescrição de drogas vegetais. Em 1996, a OMS atestou que 80% da população mundial dependia das plantas medicinais para atenção primária à saúde (ALONSO, 2008). As plantas medicinais muitas vezes são o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos (MACIEL, PINTO e JUNIOR, 2002). Elas são utilizadas desde os primórdios até dias atuais, durante milhares de anos o conhecimento foi passando gerações e acumulado por séculos, portanto esse conhecimento não deve ser desprezado pela ciência (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011).

A pesquisa com plantas envolve investigações da medicina tradicional (etnofarmacologia); isolamento, purificação e caracterização de compostos; investigação farmacológica dos extratos e compostos isolados; transformações químicas de princípios ativos; estudo da relação estrutura/atividade; estudo dos mecanismos de ação e operação de formulações para produção de fitoterápicos. Esse conjunto de atividades leva a um caminho promissor para a descoberta de novos medicamentos (MACIEL, PINTO e JUNIOR, 2002).

Apesar das plantas serem consideradas uma das principais fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas do planeta foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do mundo, esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos que reside sua maior potencialidade. A vasta flora brasileira com enorme biodiversidade, associada a uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tem o potencial para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em terapias e tecnologias apropriadas (BRASIL, 2006).

O cerrado, o segundo maior bioma do Brasil, apresenta uma flora diversificada com inúmeras potencialidades, dentre as quais se podem encontrar plantas com potencial medicinal (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011), nesta área está inserida a espécie *Rourea induta*, pertencente à família Connaraceae. Esta espécie é umas das muitas plantas utilizadas pela população que não possuem estudos científicos, portanto faz-se necessário o estudo da sua composição fitoquímica, e avaliação de suas atividades e toxicidade para comprovação de atividades biológicas e segurança do seu uso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo avaliar as características fitoquímicas das folhas da espécie *Rourea induta* Planch., e verificar as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antiparasitária, antifúngica, antibacteriana e a toxicidade dos extratos e frações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar os constituintes químicos presentes nos extratos das folhas de *Rourea induta*;
- Desenvolver e validar um método para doseamento do composto marcador da espécie, a hiperina, em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Com o extrato aquoso:
 - Verificar a ação antinociceptiva em camundongos, utilizando modelos de nocicepção química e mecânica;
 - Avaliar a toxicidade em modelo de toxicidade aguda *in vivo*;
- Com o extrato etanólico:
 - Verificar o efeito antioxidante e hepatoprotetor *in vivo*;
 - Avaliar a toxicidade em modelo de toxicidade aguda *in vivo*;
- Com ambos extratos brutos e suas frações:
 - Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* através de testes de produção de óxido nítrico e TNF- α ;
 - Avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* sobre linhagens de *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania braziliensis*;
 - Avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana sobre diferentes linhagens;
 - Verificar a citotoxicidade em células KB e MRC5;
 - Avaliar a atividade hemolítica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FAMÍLIA CONNARACEAE

3.1.1 Aspectos Gerais

A família Connaraceae inclui aproximadamente 16 gêneros, com 236 espécies distribuídas pelas regiões tropicais do mundo. Na América estão presentes cinco gêneros: *Bernardinia*, *Cnestidium*, *Connarus*, *Pseudoconnarus* e *Rourea* (FORERO, 2007), sendo *Connarus* o gênero que possui o maior número de espécies, cerca de 100, seguido por *Rourea* com 52 espécies, das quais 34 estão presentes no Brasil (THE PLANT LIST, 2011; FORERO, 2013).

É uma família de angiospermas que se apresenta na forma de plantas lenhosas, árvores ou arbustos. São plantas auto-sustentáveis ou trepadeiras, apresentam folhas alternadas, espiraladas, pecioladas podendo ser compostas ou unifoliadas. Podem apresentar ou não epiderme mucilaginosa, apresentam estômatos paracíticos, com as células da epiderme com seus eixos longitudinais paralelos às células estomáticas (WATSON e DALLWITZ, 2007).

Os troncos podem, ou não, apresentar cavidades secretoras de mucilagem. O câmbio se inicia na superfície, o floema interno é ausente em todos os gêneros, exceto no gênero *Rourea*, o qual apresenta um engrossamento se desenvolvendo a partir de um anel convencional ou anômalo do câmbio, e quando anômalo, apresenta um abaulamento concêntrico. O xilema apresenta fibras libriformes com vasos terminando em paredes simples e as paredes do parênquima são estreitas típicas (WATSON e DALLWITZ, 2007).

Suas flores geralmente são andrógenas, agregadas em inflorescências, pequenas, em geral branco amareladas, regulares, ou com algumas partes irregulares, são pouco vistosas e bissexuadas (JOLY, 1985; LORENZI e SOUZA, 2005).

Quanto à composição química desta família estudos revelam a presença de proantocianidinas, flavonóis, canferol, quercetina e miricetina, não é descrita a presença de saponinas ou sapogeninas (WATSON e DALLWITZ, 2007). Alcalóides quinolizidínicos foram encontrados na espécie *Connarus paniculatus*, triterpenos são

descritos apenas no gênero *Rourea*, cumarinas em *Byrsocarpus*, e flavonoides nos gêneros *Agelaea*, *Byrsocarpus*, *Cnestis*, *Connarus* e *Rourea* (OLIVEIRA, LEMOS e CONSERVA, 2012).

No Brasil, as espécies da família Connaraceae nativas distribuem-se em diversos ecossistemas, principalmente na Floresta Amazônica. No cerrado são comuns as espécies arbóreas, as quais são semelhantes às leguminosas, podendo ser distintas pela ausência de estípulas (LORENZI e SOUZA, 2005). Nesta vegetação a família é representada por sete espécies arbustivo-arbóreas distribuídas entre os gêneros *Rourea* e *Connarus* (LENZA *et al.*, 2008).

3.1.1.1 *Rourea induta* Planch.

Conhecida como campeira, chapeudinha ou pau-de-porco, a espécie *Rourea induta* ((sin. *Santalodes indutum* (Planch.) Kuntze)) (figura 1A e 1B) (FORERO, 2013) é caracterizada por arvoretas ou arbustos de até 4 metros de altura, ramos jovens densamente vilosos e esverdeados com folhas densamente vilosas e perpendiculares ao ramo (FONSECA e PROENÇA, 2002). Apresenta flores simples, pálido-amareladas, curtas, pequenas e planas, com verticilos reprodutivos geralmente pouco expostos aos agentes polinizadores (LENZA *et al.*, 2008).

Sua floração ocorre nos meses de maio a setembro, e a frutificação de setembro a dezembro. No Brasil, *R. induta* é abundante em áreas de Floresta Amazônica, cerrado, caatinga e Mata Atlântica, estando distribuída pelos estados do Pará, Tocantins, Maranhão, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (FORERO, 1976; FONSECA e PROENÇA, 2002; FORERO, 2013).

Existem poucos estudos na literatura com esta espécie, um estudo anterior demonstrou que ela possui leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos, cumarinas, triterpenos, antocianidinas, taninos condensados e aminogrupos, não possui alcalóides, saponinas, antraquinonas, taninos hidrolisáveis, ácidos voláteis e fixos, e heterosídeos cianogenéticos. A espécie também apresentou uma atividade antioxidante significativa *in vitro*, muito próxima à atividade do ácido ascórbico no teste da redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Esta atividade pode

estar relacionada aos quatro flavonoides derivados da quercetina que já foram isolados da espécie, entre eles está a hiperina que foi encontrada em grande quantidade (KALEGARI *et al.*, 2011; KALEGARI, *et al.*, 2012).

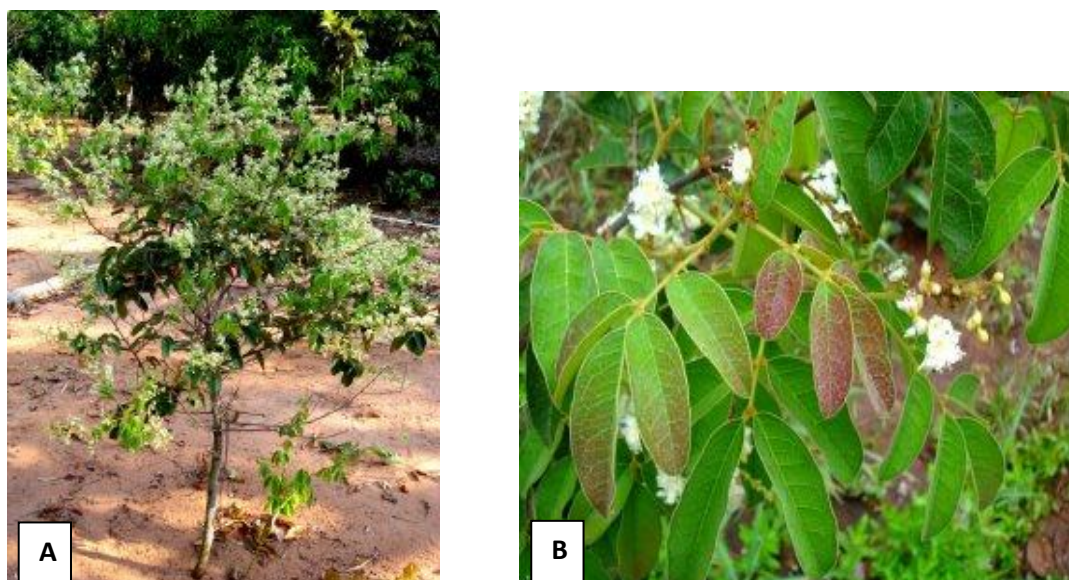


Figura 1 – Foto da espécie *Rourea induta* Planch. A – Arvoreta de *Rourea induta* Planch. B – Folhas de *Rourea induta* Planch.
Fonte: ROUREA *induta*, 2011.

A classificação taxonômica da espécie *Rourea induta* é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 – Classificação Taxonômica da espécie *Rourea induta*

	APG III (Reveal e Chase, 2011)	Cronquist (1984)
Reino	Plantae	Plantae
Superdivisão	Angiosperma	
Divisão	Eudicotiledoneas	Magnoliophyta
Classe	Eudicotiledoneas verdadeiras	Magnoliatae
Clado	Fabides ou Eurosides	Rosidae
Ordem	Oxiales	Sapindales
Família	Connaraceae	Connaraceae
Gênero	<i>Rourea</i>	<i>Rourea</i>
Espécie	<i>induta</i>	<i>induta</i>
Gênero espécie	<i>Rourea induta</i>	<i>Rourea induta</i>
Variedade	<i>induta</i>	<i>induta</i>

3.1.2 Dados Farmacológicos da Família

Várias espécies da família Connaraceae vêm sendo estudadas e tem demonstrado resultados promissores. A espécie *Byrsocarpus coccineus* Schum. e Thonn. (sin. *Rourea coccinea*) é uma planta ornamental utilizada para tratamento de várias doenças ao redor do oeste tropical da África, cuja raiz e outras partes são utilizadas para tratamento de tumores, dores musculares, reumáticas e dores de ouvido. O extrato aquoso das folhas foi estudado inicialmente por possuir atividades analgésicas, evoluindo para avaliação de atividade anti-inflamatória em vários modelos de inflamação. A administração oral do extrato aquoso, uma hora antes da injeção de carragenina e albumina, causou uma significativa diminuição dose dependente do edema em modelos animais (AKINDELE e ADEYEMI, 2007a).

Baseado nos resultados satisfatórios para atividade analgésica e anti-inflamatória, foi avaliada a atividade antipirética desta espécie. Em três modelos de hipertermia testados o extrato apresentou uma redução significativa da temperatura corporal dos animais testes, chegando a se igualar ao efeito do ácido acetilsalicílico (AKINDELE e ADEYEMI, 2007b). Recentemente outros estudos com esta espécie apresentaram resultados significativos *in vivo* em testes de hepatoproteção e atividade antioxidante. O extrato aquoso demonstrou um efeito protetor das células hepáticas, mantendo a integridade das membranas dos hepatócitos e melhorando a regeneração de células danificadas, além de aumentar a atividade de moléculas antioxidantes hepáticas (SOD, peroxidase, catalase e GSH). Estas atividades foram atribuídas provavelmente à presença de flavonoides e alcalóides neste extrato (AKINDELE *et al.*, 2010). Este extrato apresentou ainda uma atividade ansiolítica e sedativa mediada por uma modulação positiva do neurotransmissor GABA (AKINDELE e ADEYEMI, 2010).

A espécie *Cnestis ferruginea* Vahl. ex DC possui também uma atividade analgésica e anti-inflamatória comprovada por Ishola, Akindele e Adeyemi (2011). O extrato metanólico das raízes desta espécie apresentou uma resposta dose-dependente na inibição da dor nos modelos de indução de dor pela formalina, ácido acético e teste da placa quente. Sua atividade anti-inflamatória foi demonstrada por inibir o desenvolvimento de edema nos testes da carragenina, albumina, formaldeído e xileno, o que pode estar relacionado à inibição de substâncias vasoativas,

segundo Ishola, Akindele e Adeyemi (2011). A substância, amentoflavona, isolada deste extrato, foi indicada como um dos compostos ativos de *Cnestis ferruginea* (ISHOLA *et al.*, 2012). Os extratos metanólico e acetato de etila desta espécie também apresentaram um potencial hipoglicêmico em ratos com diabetes induzida por streptozotocina, sendo uma potencial fonte de isolamento de um novo antihiperglicêmico oral (ADISA *et al.*, 2010).

Estudos com *Rourea minor* (Gaertn.) Aubl., a qual é utilizada para tratamento de abrasões e lesões, demonstraram que a fração solúvel clorofórmica apresentou efeito *in vitro* contra o protozoário *Plasmodium falciparum* (HE *et al.*, 2006). A espécie *Rourea doniana* Baker apresentou uma atividade promissora do extrato hexânico do caule contra larvas de *Aedes aegypti* (OLIVEIRA *et al.*, 2010), sendo um potencial agente contra o mosquito transmissor da dengue, doença que acomete diversas regiões do Brasil.

Para a espécie *R. induta* não se tem muitos dados na literatura, sabe-se somente que sua casca é utilizada para o tratamento de reumatismo (FONSECA e PROENÇA, 2002) e que a população do cerrado utiliza a infusão das folhas para tratamento da Doença de Chagas. Como esta espécie não possui muitos dados descritos na literatura, só há dados sobre seu potencial antioxidante *in vitro*, e sabe-se que espécies da família apresentam atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, o seu uso popular pode estar relacionado a essas possíveis atividades de seus extratos.

3.2 DOR E INFLAMAÇÃO

As sensações de dor desempenham papel fundamental na proteção dos tecidos contra lesões, a qual é influenciada tanto por fatores fisiológicos quanto psicológicos. Neste sentido, o componente fisiológico da dor é denominado nocicepção (TJØLSEN *et al.*, 1992). A recepção do estímulo nociceptivo em nível periférico se dá por estruturas específicas situadas nas terminações nervosas de neurônios aferentes primários, denominadas nociceptores, os quais estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (MILLAN, 1999).

A dor pode ser classificada de acordo com sua origem e duração, nesse sentido tem-se dor neurogênica, nociceptiva, neuropática, psicogênica e inflamatória

sendo esta última geralmente a mais persistente e acompanhada de inflamação, o que gera, na maioria das vezes, hipersensibilidade decorrente da ativação e sensibilização de nociceptores periféricos por mediadores químicos induzidos por células presentes no tecido lesado ou por células responsáveis pelo desenvolvimento da inflamação (DRAY, 1997).

A resposta inflamatória é uma resposta geral e inespecífica do organismo que pode ser causada por agentes diversos, sejam de natureza química, física ou microbiológica. A inflamação é um complexo de alterações seqüenciais dos tecidos que ocorre em resposta a uma lesão. Este evento ocorre em três fases: inflamação aguda, resposta imune e inflamação crônica (SILVA *et al.*, 2002).

A inflamação aguda é caracterizada por ser a resposta inicial e inespecífica à lesão do tecido, é mediada por substâncias como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos, as quais aumentam o fluxo sanguíneo e a permeabilidade dos capilares venosos, levando à formação do edema devido ao transporte de líquidos e proteínas da circulação para o tecido. Na resposta imune são ativadas células imunologicamente competentes, sendo uma resposta mais específica, na qual são produzidos anticorpos, moléculas de reconhecimento que podem se ligar ao agente agressor melhorando a resposta do organismo ao hospedeiro. Na inflamação crônica são liberados os mediadores não proeminentes da resposta imune, como interferon e interleucinas (SILVA *et al.*, 2002; COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

A eliminação de patógenos e elementos que dão origem à inflamação é realizada por células que fazem o englobamento, degradação e eliminação dos mesmos, os chamados fagócitos, que podem ser os macrófagos, residentes nos tecidos, ou neutrófilos, e monócitos que circulam no sangue e penetram nos tecidos quando infectados. Os macrófagos teciduais são as primeiras células fagocíticas a serem ativadas, as quais secretam proteínas solúveis, as citocinas, que recrutam outras células do sistema imune para a área infectada, como os neutrófilos e monócitos, e, além disso, liberam outras substâncias indutoras da inflamação como prostaglandinas, leucotrienos e bradicinina. Os neutrófilos são as principais células fagocíticas nos tecidos infectados e inflamados, são rapidamente recrutados aos sítios de infecção, mas tem vida curta, morrem no local formando o pus (PARHAM, 2001).

As moléculas liberadas pelos fagócitos teciduais quando eles encontram uma infecção induzem um estado local de inflamação, caracterizado por dor, calor e rubor, podendo chegar à perda de função celular. As citocinas dilatam os capilares levando a um aumento do fluxo sanguíneo, tornando a pele quente e avermelhada. Esta dilatação vascular cria intervalos entre as células do endotélio provocando um extravasamento de plasma no tecido conjuntivo, caracterizado pela formação do edema, que pressiona terminações nervosas e causa dor. As citocinas também sinalizam para outras células, como neutrófilos e monócitos, para ligar-se ao endotélio e migrar para o local inflamado, essas células são chamadas células inflamatórias. Este processo aumenta o edema e a dor, mas permite que células do sistema imune cheguem rapidamente e em grandes números aos tecidos infectados, com o propósito de combater o patógeno (PARHAM, 2001).

3.2.1 Mediadores Inflamatórios

O ácido araquidônico é um constituinte de fosfolípido de membrana, que por um estímulo hormonal é liberado da membrana por ativação de fosfolipase A2. Uma vez livre este ácido graxo pode ser convertido em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos pelas enzimas cicloxigenases e em leucotrienos pela ação das lipoxigenases. A prostaciclina inibe a agregação plaquetária e é vasodilatadora; as prostaglandinas são vasodilatadoras, exarcebam o edema e estão envolvidas na patogenia da dor e febre; e os tromboxanos induzem à constricção dos vasos e a agregação de plaquetas, os primeiros passos para a coagulação sanguínea. Os leucotrienos promovem a migração de outras células, como eosinófilos e monócitos para o local afetado, estimulam a atividade enzimática para produção de superóxido, que contribuem para os danos teciduais (SILVA *et al.*, 2002; COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

O óxido nítrico (NO) é um mediador pró-inflamatório produzido pelas células endoteliais do tecido lesionado e por células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos. É um radical livre citotóxico que modula diversas ações biológicas, como vasodilatação, neurotransmissão, inibição da agregação plaquetária e a eliminação de patógenos por macrófagos. Inflamações agudas e crônicas levam a uma

produção elevada deste radical através de uma maior expressão da sua enzima formadora, óxido nítrico sintase induzida (iNOS), sendo o nível de NO no organismo um indicador do grau da inflamação (YANG *et al.*, 2009; COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009). Quando NO encontra-se em quantidade excessiva no organismo devido a uma inflamação, ele pode se tornar um radical tóxico podendo causar danos celulares em macromoléculas como proteínas, DNA e lipídios desencadeando respostas desfavoráveis nas células (WEN *et al.*, 2011).

As citocinas liberadas durante um processo inflamatório são TNF- α (fator de necrose tumoral α) e interleucinas, essas substâncias induzem efeitos locais como expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, facilitando a migração e adesão de leucócitos, induzem a produção e liberação de proteínas de fase aguda e aumentam a síntese de prostaciclina (BILATE, 2007; COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Nas doenças inflamatórias, a homeostase entre a produção de antioxidantes e pró-oxidantes pode ser afetada, o chamado estresse oxidativo (SIES, 1997) acarretando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez, destroem o antígeno responsável pelo processo inflamatório. Tal produção excessiva, em contrapartida, leva à injúria tecidual pelo dano causado às macromoléculas e lipoperoxidação de membranas. Ademais, as EROs podem atuar como mensageiras secundárias, ativando a produção de outros mediadores envolvidos no processo inflamatório, essas moléculas são intermediários altamente reativos, os quais já são comprovadamente uns dos responsáveis pelo desenvolvimento de inúmeras patologias, como aterosclerose, complicações do diabetes e doenças neurodegenerativas, além de poderem causar mutações no DNA podendo levar ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres (GARDÈS-ALBERT, 2003).

A peroxidação lipídica é umas das primeiras consequências do estresse oxidativo, e pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação das EROs sobre os lipídios insaturados das membranas celulares levando a

destruição celular, falência de mecanismos ou até a sua morte. A verificação da oxidação dos lipídios pode ser feita através da determinação do malondialdeído (MDA), um dos produtos secundários da oxidação de ácidos graxos altamente reativo, o qual pode reagir com grupos aminos, proteínas, fosfolipídios ou ácidos nucléicos induzindo modificações nas moléculas biológicas (LIMA e ABDALLA, 2001).

Os organismos eucariontes possuem mecanismos próprios de defesa antioxidante. Existem dois sistemas com tal função, o sistema enzimático e o não-enzimático. O sistema enzimático consiste nas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT) e glutathione peroxidases (GPx). Os mecanismos não-enzimáticos são compostos pela glutathione reduzida (GSH), ácido úrico, proteínas de transporte de metais de transição, entre outros (SIES, 1997). Estas enzimas são capazes de converter os radicais livres novamente em moléculas estáveis. O primeiro passo é a dismutação dos radicais de oxigênio em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que é feito pela SOD, este então pode ser degradado pela GPx e CAT à H_2O (AKINDELE *et al.*, 2010). A CAT é inativa frente a hidroperóxidos orgânicos, já a GPx é altamente ativa na presença dos mesmos, além de reduzir os hidroperóxidos ela reduz peróxidos alifáticos e aromáticos à água e seu álcool inerte correspondente, uma reação dependente de GSH e NADPH. Quando o estresse oxidativo é alto e os mecanismos próprios não conseguem dar conta de contê-lo é necessário o uso de antioxidantes exógenos, que podem ser consumidos na alimentação ou com uso de alguns medicamentos, entre eles estão beta-caroteno, vitamina C e E, selênio, zinco, cobre, polifenóis e isoflavonas da soja.

3.4 FLAVONOIDES: ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIOS

As reações que ocorrem com a participação de radicais livres têm demonstrado envolvimento em muitos processos biológicos que acarretam danos a lipídios, proteínas, membranas e ácidos nucléicos podendo levar a uma variedade de doenças. Portanto, existe um interesse crescente no estudo da ação antioxidante de substâncias obtidas de plantas principalmente os compostos fenólicos, tais como os flavonoides (AGUIAR *et al.*, 2009).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal, sendo encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos. Apresentam um núcleo característico C₆-C₃-C₆, sua diversidade estrutural pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização, podendo ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos, derivados metilados ou acilados (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

Diversas atividades biológicas são atribuídas a essa classe de polifenóis, entre elas as atividades antitumoral, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e antiarterosclerótica. Muitas das ações biológicas podem ser atribuídas a sua atividade antioxidante, sua habilidade de desativar moléculas reativas de oxigênio, inibindo a peroxidação lipídica, originada pelos radicais livres produzidos como consequência do dano tecidual, mantendo, desta forma, a integridade e fluidez da membrana, diminuindo a formação de peróxidos e impedindo alterações na sinalização intracelular e função celular (VOLP *et al.*, 2008; COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

Os flavonoides possuem a propriedade de inibir a via da cicloxigenase e da lipoxigenase no metabolismo do ácido araquidônico que atuam na síntese de prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos. Estudos têm demonstrado que eles podem aumentar o relaxamento vascular e exercer um efeito inibitório na exsudação de proteínas e migração de leucócitos. Os flavonoides quercetina e catequina inibiram aspectos da função de neutrófilos humanos *in vitro*, os quais contribuem para o processo inflamatório: liberação de enzimas lisossomais e produção de radicais livres. Além disso, esses flavonoides apresentaram forte efeito inibidor da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico e ADP (adenosina difosfato) (SILVA *et al.*, 2002).

Um excesso de radicais livres no tecido pode levar a uma reação descontrolada em cadeia e a peroxidação lipídica, a qual pode ser inibida por inativação enzimática dos radicais livres pelos antioxidantes. Tem sido proposto que os flavonoides também atuam como antioxidantes diretos eliminando os ânions superóxido e radicais hidroxilas, pois inibem a reação em cadeia dos radicais livres doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, formando um radical de flavonoide, o qual reage com o radical livre terminando a reação em cadeia. A ação

antioxidante desses compostos também é verificada pela estimulação das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx (SILVA *et al.*, 2002).

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Vírus, bactérias, fungos e protozoários afetam a saúde humana, todos os quais apresentam problemas de resistência aos agentes antimicrobianos disponíveis comercialmente. A resistência microbiana tem aumentado muito nos últimos anos, o que torna cada vez mais necessário a busca de alternativas, como novos agentes antimicrobianos. Para tanto as plantas medicinais sempre foram e sempre serão uma grande fonte de recursos para a busca de novos compostos. Apesar de centenas de espécies já terem sido estudadas contra determinados agentes microbianos a maioria não foi avaliada adequadamente (MAHESH e SATISH, 2008).

3.5.1 Atividade Antifúngica e Antibacteriana

As infecções fúngicas são uma das grandes causas de morbidade e mortalidade principalmente em pacientes enfermos e/ou imunocomprometidos, sendo a maioria das infecções causadas por leveduras do gênero *Candida sp.* ou fungos filamentosos do gênero *Aspergillus sp.* Além disso, as leveduras do gênero *Candida sp.* tem sido apontadas como um dos principais agentes causadores de infecções sistêmicas de origem hospitalar e de infecções da corrente sanguínea (MORETTI, 2007).

Com relação às bactérias são inúmeras as linhagens que podem acometer a saúde do homem provocando os mais diversos tipos de problemas, dentre elas encontram-se *Staphylococcus aureus*, responsável por infecções supurativas superficiais e profundas, e síndromes ligadas à liberação de toxinas. *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* são bactérias que vivem normalmente no organismo humano, mas, às vezes, podem desencadear algumas infecções como infecções cutâneas e nasais, diarreias e gastroenterites, respectivamente.

Com relação aos compostos de origem vegetal com atividade antimicrobiana já comprovada, encontram-se os flavonoides, como a 5,7,4-trihidroxi-8-metil-6-(3-metil-[2-butenil])-(2S)-flavanona, isolada da espécie *Eysenhardtia texana* que apresenta atividade contra o fungo oportunista *Candida albicans*, e o própolis cuja atividade contra dermatófitos e *Candida sp.* é atribuída ao alto teor de flavonoides encontrado no mesmo. Os flavonoides apresentam também atividades contra diversos tipos de vírus e bactérias, e alguns autores reportam o sinergismo entre diferentes flavonoides como responsável por esta atividade, ou também o sinergismo entre flavonoides e outros agentes antimicrobianos encontrados nos vegetais (CUSHNIE e LAMB, 2005; OZÇELIK *et al.*, 2008).

3.5.2 Doenças Parasitárias

Doenças parasitárias são aquelas causadas por endoparasitas (protozoários ou metazoários) que vivem em associação com organismo humano, de onde retiram os meios para sua sobrevivência. As doenças parasitárias transmitidas por vetores como malária, tripanossomíase, esquistossomose consistem em um obstáculo no desenvolvimento de países de baixa renda, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade dos mesmos. Elas fazem parte do grupo de doenças infecciosas e parasitárias (DIP) que ocupam um papel importante na causa de morte no Brasil, sendo geralmente associadas à pobreza e à qualidade de vida, em aspectos relacionados às más condições de habitação, alimentação e higiene (REGUERA, TEKWANI e BALAÑA-FOUCE, 2005; SOUZA, 2010).

No Brasil as doenças de maior prevalência são malária, doença de Chagas; leishmanioses e esquistossomoses (SOUZA, 2010).

3.5.2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, e podem ser classificadas em três tipos de manifestação: visceral, mucocutânea e

cutânea. No Brasil os casos de Leishmaniose cutânea e mucocutânea são causados por *Leishmania braziliensis*, no entanto sabe-se que existem mais de 30 tipos de Leishmanias classificadas de acordo com o local de origem, sendo nas Américas 11 espécies conhecidas como causadoras de doenças humanas. As leishmanioses cutâneas e mucocutâneas são também conhecidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sua manifestação se dá através de feridas cutâneas que tendem a cicatrizar sozinhas, no entanto podem chegar até mucosas tornando o tratamento difícil. A leishmaniose visceral engloba vários sinais clínicos, caracterizada por febre de longa duração, mas pode permanecer assintomática, e se a infecção não for tratada ela pode ser fatal (ALBERNAZ, 2010; BRASIL, 2010).

Estes parasitas se apresentam nas formas amastigotas quando estão infectando o homem e nas formas promastigotas quando infectam o inseto, seu ciclo de vida é heteroxênico, pois vive um período em hospedeiros mamíferos e um período em insetos fêmeas (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae), responsáveis pela sua transmissão, popularmente conhecidos como mosquito palha (SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA, 2004; REITHINGER, 2007).

O controle da doença é feito no combate ao vetor e extermínio de cães infectados, os quais são reservatórios do parasita, e no tratamento de indivíduos infectados. O tratamento é feito com uma série de fármacos, sendo o fármaco de primeira escolha o antimonial pentavalente. Este medicamento apresenta uma série de problemas, como resistência do parasita, efeitos colaterais e baixa eficácia, além do fato de todos os fármacos disponíveis serem de uso parenteral, o que faz que muitos pacientes abandonem o tratamento, portanto faz-se necessária a busca de novos compostos ativos contra este parasita para o tratamento da doença (SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA, 2004; BRASIL, 2010).

3.5.2.2 Tripanossomíase

A tripanossomíase americana, mais conhecida como Doença de Chagas, é uma doença de caráter crônico causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Esta doença é uma zoonose que atinge desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e foi considerada, na maior parte do século XX, um dos principais problemas de

saúde pública da América Latina (WHO, 2002). Seu vetor é o inseto conhecido como barbeiro, ou chupão, o qual se cria facilmente nas casas de barro, pau-a-pique, presentes em áreas rurais.

A transmissão da doença ao homem ocorre através da picada do inseto contaminado, o qual deposita fezes infectadas com o parasita no local facilitando a entrada do mesmo na corrente sanguínea. Às vezes a contaminação pode ocorrer pelo contato com mucosas ou rompimento da pele, e em alguns casos por surtos de alimentos infectados (WHO, 2011). Ao invadir o organismo do hospedeiro vertebrado o parasita está na sua forma tripomastigota, e imediatamente inicia-se o processo de transformação para a forma amastigota, a qual se encontra livre e em contato com várias organelas da célula. Inicia-se então a divisão celular e quando a célula está cheia de formas amastigotas inicia-se o processo de transformação para formas tripomastigotas, as quais quando adquirem um flagelo longo, provocam a ruptura da célula e a liberação de vários parasitas ao meio extracelular. Estas, por sua vez, podem infectar outras células ou atingir a corrente sanguínea e distribuir-se pelo organismo (ALBERNAZ, 2010).

A fase aguda da doença é normalmente caracterizada por ser assintomática ou oligossintomática, sendo o primeiro sinal a presença de um cancro de pele, chamado chagoma, que pode ser acompanhado de dores de cabeça, febre, mialgia, dor abdominal, diarreia, entre outros sintomas gerais. Na fase crônica, quando o parasita atinge os tecidos alvos, principalmente o coração, a doença pode ser assintomática, o que ocorre na maioria das vezes, ou pode se apresentar na forma cardíaca, com cardiomiopatias, arritmias e insuficiência cardíaca; ou ainda na forma digestiva de megaesôfago e megacólon (WHO, 2011).

O tratamento da Doença de Chagas é um desafio, pois os fármacos disponíveis, benzonidazol e nifurtimox, são eficazes para a fase aguda, mas para a fase crônica não são muito eficazes e causam diversos efeitos colaterais. Quando o tratamento é feito na fase aguda as chances de cura estão em torno de 80%, mas na fase crônica esse índice cai para 8 a 30%. Novos fármacos vêm sendo desenvolvidos e testados em animais e humanos, porém nenhum elimina totalmente a infecção e promove a cura definitiva, como é o caso do posconazol, um análogo do itraconazol, que é o mais forte candidato para novos tratamentos da Doença de Chagas. Dessa maneira faz-se necessária a busca de novos compostos que possam atuar contra este parasita (OLIVEIRA, *et al.* 2008; LOZANO, 2011, DIAS, COURA e YASUDA, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material trabalhado é composto pelas folhas de *Rourea induta* Planch., Connaraceae, coletadas pelo Sr. Enio Jonas Karkle, na cidade de Rondonópolis, Mato Grosso, nos meses de novembro de 2009 e agosto de 2010. As folhas foram secas à sombra e uma exsicata da espécie está registrada no Museu Botânico de Curitiba pelo número 261574.

4.1.1 Determinação de Umidade

Para determinação da quantidade de água nas folhas de *R. induta* foi empregado o método da Farmacopéia Brasileira (2010), o qual consiste em pesar determinada quantidade de material vegetal e submetê-lo a estufa com temperatura entre 100-105°C durante cinco horas, proceder a primeira pesagem após esfriamento à temperatura ambiente em dessecador, retornar a estufa e assim sucessivamente até o resultado de duas pesagens não diferir por mais de 5 mg. O resultado é apresentado em porcentagem de água em relação ao material vegetal seco ao ar.

4.1.2 Determinação de Cinzas Totais

Para determinar as cinzas totais presentes nas folhas de *R. induta*, empregou-se método da Farmacopéia Brasileira (2010). Pesou-se o material vegetal, o qual foi transferido para um cadinho calcinado, resfriado e pesado, incinerou-se até eliminação do carvão (não ultrapassando 450 °C), resfriou-se em dessecador, procedeu-se a pesagem e cálculo da porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal seco ao ar.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

O extrato bruto foi obtido a partir de 2,3 kg do material vegetal seco e moído em etanol 99%, em aparelho de Soxhlet por 96 h, o qual foi concentrado em evaporador rotativo até 300 mL e filtrado. O extrato bruto foi usado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido em Soxhlet com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio, acetato de etila. Após este procedimento foram obtidas as frações correspondentes e a fração residual.

O extrato aquoso foi preparado a partir da infusão a quente de 400 g (20%) por 30 min, por três vezes. O extrato foi filtrado, concentrado e liofilizado.

4.2.1 Filtração em Membrana de Poliamida

Após a verificações dos perfis fitoquímicos dos extratos e frações, e após o isolamento dos primeiros compostos, verificou-se que os compostos fenólicos correspondiam aos compostos majoritários dos extratos e frações de *R. induta*, a maioria já presente em outras espécies. Portanto, para auxiliar no isolamento de compostos de outras classes fitoquímicas, as amostras foram filtradas em membrana de poliamida.

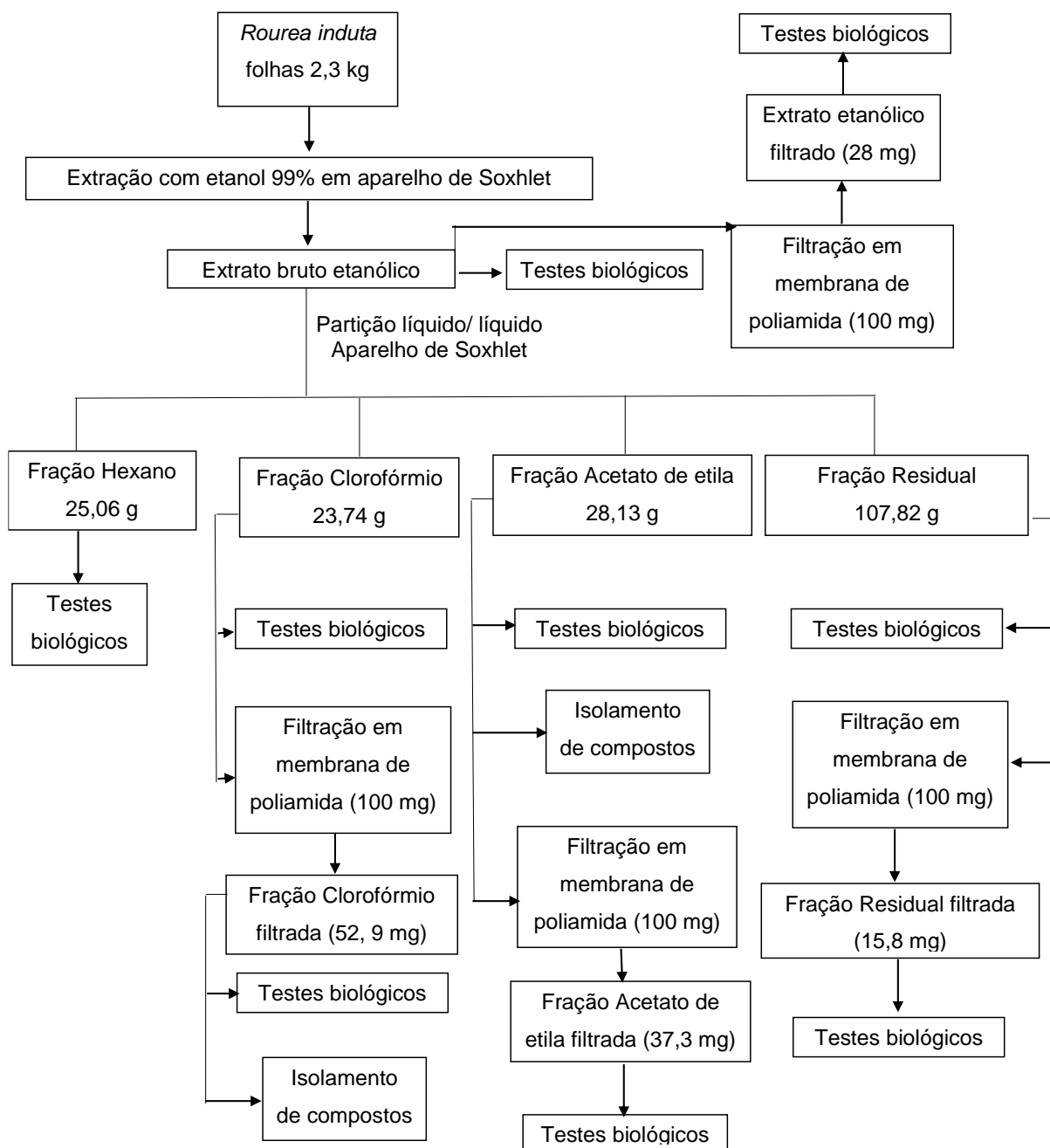
Uma porção individual de 100 mg de cada extrato e fração de *R. induta* foi dissolvida em acetato de etila (6 mL) e metanol (2 mL), filtrada em membrana de poliamida Chromabond® PA (coluna polipropileno 6 mL) e seca em evaporador rotativo. As amostras filtradas foram utilizadas em alguns testes biológicos e isolamento de compostos.

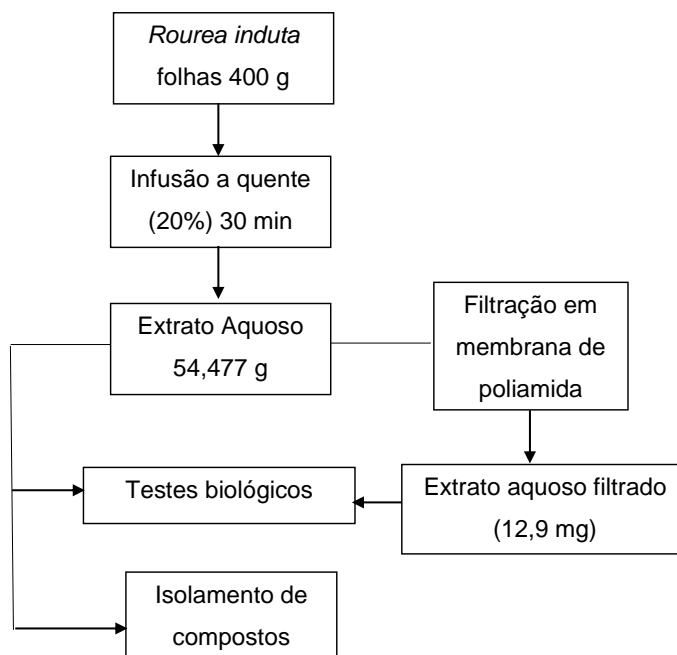
4.2.2 Determinação do Teor de Sólidos

Utilizando-se técnica adaptada de Miguel (2003), depositou-se 1 mL de extrato bruto etanólico a ser analisado em placa de petri, levou-se a estufa (100 °C) até peso constante e procedeu-se os cálculos. O resultado é apresentado em

quantidade de sólidos em 1 mL e em porcentagem do teor de sólidos em relação ao material vegetal.

4.2.3 Fluxograma de Obtenção dos Extratos e Frações





4.3 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

Os procedimentos de isolamento e identificação de compostos foram realizados no *Institut de Chimie de Substances Naturelles em Gif-sur-Yvette, França*.

4.3.1 Fração Acetato de Etila

A fração acetato de etila (1 g) foi fracionada por cromatografia flash Reveleris® em coluna de sílica (Reveleris®) 40 µm, 40 g, e fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol de acordo com o gradiente apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Gradiente de solventes para fracionamento da fração acetato de etila

Tempo (min.)	Hexano (%)	Acetato de etila (%)	Metanol (%)
0	95	5	0
8	80	20	0
16	0	100	0
20	0	100	0
25	0	70	30
30	0	70	30

As subfrações obtidas foram agrupadas de acordo com o perfil em cromatografia em camada delgada (CCD). Depois de reunidas as frações foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica e preparativa (Waters® 600 controler), com detector de arranjo de diodos (DAD) 2996, detector evaporativo à dispersão da luz (DEDL) 2424, e coluna Sunfire® C18 (4,6x150 mm, 5 µm - analítica) (19x150 mm, 5 µm - preparativa) para verificação de perfil e isolamento de compostos, respectivamente.

A subfração AC30-33 (57 mg) foi submetida à CLAE preparativa, com coluna Sunfire® C18 (5µm, 19x150 mm) utilizando um gradiente de separação de 90% de água e 10% de acetonitrila até 70% de água e 30% de acetonitrila em 30 min de corrida, com fluxo de 17 mL/min, os solventes foram modificados com 0,1% de ácido fórmico. Para a subfração AC34-35 (25,85 mg) o gradiente utilizado na cromatografia preparativa, com a mesma coluna que o procedimento anterior, iniciou-se em 85% de água e 15% de acetonitrila, também com 0,1% de ácido fórmico, até 70% e 30%, respectivamente, em 30 min e 17 mL/min. Com a subfração AC36-37 (86 mg) realizou-se CLAE preparativa, no mesmo equipamento e coluna, com um método isocrático de solventes de 85% de água e 15% de acetonitrila durante 45 min, solventes modificados com 0,1% de ácido fórmico.

4.3.2 Extrato Aquoso

O extrato aquoso (500 mg) também foi fracionado por cromatografia flash, mas em coluna de fase estacionária C18 (fase reversa - Reveleris®- 40 µm, 40 g), e fase móvel água e acetonitrila (tabela 2).

Tabela 2 – Gradiente de solventes para fracionamento do extrato aquoso

Tempo (min.)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	100	0
28	0	100
35	0	100

As frações obtidas foram submetidas à CLAE analítica para verificação do perfil cromatográfico utilizando um método geral de 100% de água até 100% de acetonitrila, ambos com 0,1% de ácido fórmico, em 35 min, para então ser feito o agrupamento de amostras semelhantes. Posteriormente foi feito o isolamento de compostos por CLAE preparativa.

A fração EAS7 (14 mg) foi submetida à cromatografia preparativa em CLAE com coluna Sunfire® C18 (5 µm, 19x150 mm) utilizando um gradiente de separação com 85% de água e 15% de metanol, ambos com 0,1% de ácido fórmico, até 45% de água e 55% de metanol, em 35 minutos de corrida com fluxo de 17 mL/min. A fração EAS12 (41 mg) também foi fracionada em CLAE preparativa, para a qual se utilizou um gradiente de água e acetonitrila, cada um com 0,1% de ácido fórmico, de 85% e 15%, respectivamente, até 80% e 20% em um tempo de corrida de 18 min, com fluxo de 17 mL/min.

4.3.3 Fração Clorofórmio

Quatrocentos miligramas da fração clorofórmio, dissolvidas em 6 mL de acetato de etila e 2 mL de metanol, foram filtradas em membranas de poliamida

obtendo-se 190 mg da fração filtrada, dos quais 170 mg foram dissolvidos em 7 mL de metanol e submetidos à CLAE preparativa com um gradiente de 85% de água e 15% de acetonitrila (0,1% de ácido fórmico em cada) até 75% e 25%, respectivamente, em 30 min, em coluna Sunfire® C18 5µm (19x150 mm) e 17 mL/min. O pico coletado não se apresentou puro após a CLAE preparativa, o que levou a uma nova purificação. Este procedimento foi realizado em CLAE analítica, devido a quantidade disponível (3,5 mg), utilizando-se uma coluna analítica Luna® PFP (pentafluorfenil propil) (4,6 x 150 mm), coluna esta adequada para separação de compostos de alta polaridade, aromáticos e isômeros. Como solventes fez-se uso de água com 0,1% de ácido fórmico e metanol com 0,1% de ácido fórmico, em um método isocrático de 80% e 20%, respectivamente, por 35 min. A fração residual da primeira preparativa desta amostra, denominada CPF (39 mg), foi purificada em CLAE preparativa (Gilson®) com método isocrático 75% de água com ácido fórmico (0,1%) e 25% de acetonitrila com ácido fórmico (0,1%) por 15 min em coluna Luna Phenomenex® C18 (5 µm, 21,20 x 250 mm). O pico coletado foi repurificado em CLAE analítica (Waters®) com coluna Hipercarb (5 µm, 4,6 x 100 mm), e método isocrático de 70% de água com ácido fórmico (0,1%) e 30% acetonitrila com ácido fórmico (0,1%) por 12 min.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

Os compostos puros foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional de ^{13}C e ^1H , e RMN bidimensional COSY (*correlation spectroscopy*), HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*), HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*) e NOESY (*nuclear overhauser effect spectroscopy*), em equipamento Bruker® 300, 500 ou 600 MHz com sonda de 1 mm; espectrometria de massas de alta resolução (Waters® LCT Premier XE com analisador por tempo de voo e ionização por eletrospray - ESI). Para os compostos com centros assimétricos a configuração absoluta foi determinada através do dicroísmo circular (Jasco J-180 spectropolarimeter®) e de rotação óptica (Polarímetro Aton Paar MCP 300).

4.4.1 Síntese e Derivatização de Derivados do Ácido Quínico

Para a verificação da conformação dos compostos derivados do ácido quínico (ácido clorogênico, ácido neoclorogênico e éster metílico do ácido neoclorogênico), devido a divergências com as literaturas encontradas, foi necessário que esses compostos fossem derivatizados e submetidos à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS). Para tanto, sintetizou-se a lactona triacetato derivada do ácido quínico, a qual possui a conformação contrária ao ácido quínico normalmente encontrado.

A síntese foi feita adicionando-se 5 g de ácido quínico comercial (Sigma Aldrich®), a 250 mL de ácido acético e 3,5 mL de ácido sulfúrico, sob refluxo por 100 h. Passado esse tempo a mistura foi resfriada a 0 °C e adicionou-se 250 mL de anidrido acético lentamente sob agitação, essa mistura foi deixada em agitação por 20 h. Em seguida, a mesma foi vertida sob 750 mL de gelo e agitada por mais 1 h. Extraíu-se seis vezes com diclorometano e a parte orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada. Adicionou-se heptano e evaporou-se para retirar o anidrido acético e o ácido acético. Foi acrescentado acetato de etila e hexano para provocar a cristalização, depois os cristais foram filtrados e secos (BARTLETT, McLAREN e MARX, 1994). A presença da lactona triacetato foi confirmada pelo espectro de RMN-¹H.

Uma amostra da lactona sintetizada, de ácido clorogênico comercial (Sigma Aldrich®), e dos compostos isolados (AC34-35, EAS7-1 e EAS7-2) foram saponificados para a liberação do ácido quínico. Um mol da substância a ser saponificada foi adicionado a 8 mols de LiOH, 200 µL de THF e 20 µL de água, a mistura permaneceu sob agitação durante uma noite e depois foi levada à secura (STIEN *et al.*, 1999). Os produtos saponificados e o ácido quínico comercial foram derivatizados através de uma reação de sililação, na qual 500 µL do reativo MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) (Sigma Aldrich®) foi adicionado à substância com 1 mL de acetonitrila, a mistura foi agitada por 30 segundos, aquecida a 70°C por 15 min e analisada por CG/MS (cromatógrafo à gás Varian 450 equipado com espectrômetro de massa íon-trap MS240), em coluna de 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 mM filme, com gás transportador hélio (1 mL/min) e variação de temperatura da coluna de 80 °C a 250 °C com 5 °C/min (FLUKA CHEMIKA, 1995).

4.5 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES

Desenvolveu-se um método para quantificação do flavonoide marcador da espécie *Rourea induta*, hiperina, que foi isolada nesta espécie e identificada em um estudo anterior (KALEGARI *et al.*, 2011). O método foi desenvolvido em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência CLAE (Merck® Hitachi – Elite Lachrom), com detector DAD L-2450, em coluna XTerra® RP18 (5 µm, 4,6x250 mm). A fase móvel foi composta por uma solução ácida, constituída de ácido sulfúrico 0,02 N e ácido fosfórico 0,2%; e acetonitrila para fazer o gradiente de polaridade, fluxo de 1 mL/min com leitura em 356 nm. O esquema do gradiente do método está apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Método para doseamento de flavonoides no extrato de *Rourea induta*

Tempo (min.)	Fase ácida (%)	Acetonitrila (%)
0	98	2
30	69	31
35	60	40
36	5	95
40	5	95
41	98	2
45	98	2

Este método foi validado de acordo com a resolução 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para fitoterápicos: linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez.

4.6 ANÁLISES FARMACOLÓGICAS

4.6.1 Animais

Para os testes de antinocicepção e toxicidade aguda foram utilizados camundongos Swiss adultos (18 a 35 g) de ambos os sexos, mantidos em

temperatura controlada de 22 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h e com água e ração à vontade. Os quais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 h antes da realização dos experimentos. Para os testes de antinocicepção cada ensaio foi composto por quatro grupos, referentes a três doses testadas e um grupo controle (n=8). Para toxicidade aguda 70 animais foram utilizados para cada extrato testado, os quais foram distribuídos em 3 grupos teste (n=20) e um controle (n=10). Os testes foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, certificado no. 535, da Universidade Federal de Santa Catarina PP00745, e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCPR, protocolo nº 594 (anexos).

Para a avaliação da capacidade antioxidante foram utilizados ratos Wistar (160 – 200 g) mantidos com condições controladas de temperatura (22 ± 3 °C) e fotoperíodo de 12 h, com água e ração *ad libitum*. Os testes foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, protocolo nº. 029/2011 CEUA/HUOL/UFRN. Em todos os testes os animais foram tratados com extrato via oral por gavagem.

Os testes de antinocicepção foram desenvolvidos no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação da Universidade Federal de Santa Catarina. A capacidade antioxidante e hepatoprotetora foi realizada no Laboratório Multidisciplinar da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. E os testes de toxicidade aguda foram desenvolvidos no Laboratório de Estomatologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

4.6.2 Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Formalina

O procedimento utilizado foi semelhante ao previamente descrito por Santos e Calixto (1997) e Santos e colaboradores (1999a), no qual camundongos receberam 20 µL de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região intraplantar da pata posterior direita. Após a injeção os animais foram observados de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-30 min (fase inflamatória), sendo avaliado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina. Os

animais foram tratados oralmente com o extrato aquoso nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg, um grupo controle recebeu somente o veículo (solução salina) (10 mL/kg, v.o.), e 1 h após o tratamento os animais foram submetidos ao teste da formalina. A hiperina, composto em grande quantidade no extrato foi testada nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg v.o.. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão e tratados estatisticamente para análise da variância com teste de ANOVA seguida do teste de Newman Keuls para comparação dos grupos, com significância estatística valores de $p < 0,05$.

4.6.3 Avaliação do Envolvimento do Sistema Opióide

Camundongos foram pré-tratados com naloxona (antagonista não-seletivo dos receptores opióides, 1 mg/kg, i.p). Depois de 20 min os animais receberam o extrato aquoso (100 mg/kg, v.o.) ou morfina (controle positivo, 2,5 mg/kg, s.c.) de acordo com Santos *et al.* (1999b). Uma hora pós o tratamento com extrato ou 30 min após administração da morfina a resposta nociceptiva foi avaliada em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os dados foram tratados estatisticamente com teste de ANOVA seguido do teste de Newman Keuls ($p < 0,05$).

4.6.4 Modelo de Dor Inflamatória Crônica Induzida pelo Adjuvante Completo de Freund

Neste modelo os camundongos foram tratados com 20 μ L de Adjuvante Completo de Freund (CFA) a 70%, subcutaneamente na superfície plantar da pata posterior direita. A hiperalgesia mecânica foi avaliada conforme descrito por Bortolanza *et al.* (2002), cujo método consiste na aplicação de filamentos de Von Frey (0,4 g) na pata injetada com o CFA (*Mycobacterium tuberculosis* Sigma-Aldrich®), estímulo que normalmente não causa dor, sendo a resposta nociceptiva expressa como a percentagem de retirada da pata a 10 estímulos induzidos por estes filamentos, verificando-se a presença, ou não, de hipersensibilidade mecânica, ou seja, se o animal sente dor a um estímulo normalmente indolor.

Para avaliação de um tratamento agudo com o extrato aquoso os animais foram tratados com o extrato (100 mg/kg, v.o.) 24 h após a estimulação com CFA, e a presença de hipersensibilidade foi verificada em 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24 h após o tratamento para verificação do curso temporal (*time course*) do extrato na redução da hipersensibilidade mecânica, através do qual se escolheu a melhor hora de avaliação. Para avaliação do efeito de um tratamento a longo prazo com o extrato aquoso os animais foram tratados diariamente com extrato (100 mg/kg, v.o.) e avaliados por 10 dias duas horas após o tratamento. Para se excluir a possibilidade do extrato provocar algum tipo de influência sobre a nocicepção um dos grupos não recebeu CFA na pata e foi tratado diariamente com o extrato na dose de 100 mg/kg v.o. Um grupo controle recebeu injeção de salina (20 µL) 0,9% na pata direita traseira. O tratamento foi interrompido por dois dias e reiniciado para a verificação de tolerância. Os resultados são expressos como média e desvio padrão, para análise estatística utilizou-se o teste de ANOVA seguido do teste de Bonferroni para comparação de grupos ($p < 0,05$).

4.6.4.1 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias

No último dia de avaliação da hipersensibilidade mecânica com CFA, os animais foram eutanasiados, e foram retiradas a pele da pata inflamada e a porção lombar da medula espinhal para análise de citocinas inflamatórias. As amostras foram homogeneizadas em tampão PBS (salina tamponada com fosfato) contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,1 mM, EDTA 10 mM, aprotinina 2 ng/mL, e cloreto de benzetônio 0,1 mM. Os homogenatos foram transferidos para tubos Eppendorf de 1,5 mL, centrifugado a 3000 g por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi armazenado a -80 °C (BOBINSKI *et al.*, 2011). Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram utilizadas para avaliação dos níveis de TNF- α , IL-1 β , os quais foram quantificados em kits de Elisa de imunoensaio (R&D®) de acordo com as instruções do fabricante. As absorbâncias foram medidas em leitor de placas em 450 e 550 nm.

4.6.5 Avaliação de Dor Induzida por Citocinas

Os camundongos pré-tratados oralmente com o extrato aquoso (100 mg/kg v.o.) receberam, 60 min depois, uma injeção intratecal de IL-1 β (1,0 pg/sítio) ou TNF- α (0,1 pg/sítio) e avaliou-se por 15 min o tempo que o animal permaneceu mordendo o ventre e o dorso. O comportamento de morder foi definido como um movimento único da cabeça voltada para os flancos ou membros posteriores, resultando no contato do focinho com qualquer região do corpo.

4.6.6 Avaliação da Atividade Locomotora e Temperatura Corporal

O comportamento dos animais foi verificado pelo teste do campo aberto conforme descrito previamente por Rodrigues *et al.* (2002). Os animais, tratados com as doses de 30, 100 e 300 mg/kg, v.o., foram colocados em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, com a assoalho da arena dividido em 12 quadrados iguais e analisou-se o número de cruzamentos, com todas as patas (*crossing*), que o animal fez durante 6 min, os quais foram comparados a um grupo controle tratado com solução salina. A temperatura corporal dos animais foi medida na junção entre a cauda e corpo do animal antes e 60 min após a administração do extrato aquoso (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.). Os resultados são apresentados como média e desvio padrão e tratados estatisticamente com o teste ANOVA seguido do teste de Newman Keuls ($p < 0,05$).

4.6.7 Determinação da Capacidade Antioxidante *in vivo*

Foram utilizados 20 animais, ratas fêmeas, divididos em 4 grupos com 5 animais cada. Os animais de todos os grupos, exceto o grupo controle negativo, receberam o CCl₄ em dose única (2 mL/kg i.p.) diluído em óleo de milho 50% v/v, para indução do dano hepático. Após 24 h da indução foi iniciada administração oral do extrato e do Legalon[®] por 7 dias. Os grupos ficaram divididos da seguinte maneira: grupo controle negativo que só recebeu injeção de veículo; um grupo

toxicante que recebeu somente a injeção do toxicante (CCl₄, 2 mL/kg, i.p., dose única); um grupo controle positivo que recebeu o toxicante em dose única e Legalon® (50 mg/Kg v.o.) por 7 dias; e o grupo teste em qual foi administrado o CCl₄ e o extrato etanólico de *R. induta* (500 mg/kg, v.o., 7 dias).

Após 24 h do término da última administração os animais foram eutanasiados para avaliação dos parâmetros bioquímicos, antioxidantes e histopatológicos (BRITO, 2009). Todos os resultados estão expressos como média e desvio padrão, analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

4.6.7.1 Coleta e processamento das amostras

Após anestesia com tiopental (40 mg/kg) os animais foram submetidos à laparotomia. Retiraram-se 6 mL de sangue por punção cardíaca para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fígados foram retirados para análise histopatológica e quantificação das enzimas antioxidantes.

4.6.7.2 Avaliação bioquímica

A determinação das concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e bilirrubina total (BT) foi realizada utilizando-se Kits Biosystems de acordo com as instruções do fabricante, e as leituras feitas pelo método Cinético de UV-IFCC (Analisador PlennoMax - PlennoR, Brasil).

4.6.7.3 Homogenato do fígado

O fígado retirado dos animais foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 7,0), na proporção de 1,0 g de fígado para 9,0 mL de tampão

em homogenizador Potter-Elvehjem, centrifugado a 827g/4°C/4 min. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação da atividade da CAT, SOD, GPx, GSH e SRAT.

4.6.7.4 Determinação da glutathiona reduzida (GSH)

Foram utilizados 200 µL de homogenato adicionados a 1,8 mL de água destilada; agitando por 1 min, deixando sistema em repouso por 10 min a temperatura ambiente para hemólise completa. Após adição de 3 mL de TCA (ácido tricloroacético) a 12%, e incubação por 5 min, a reação foi centrifugada (3000 min⁻¹/10 min), adicionaram-se 400 µL do sobrenadante a um tubo contendo 1,6 mL de tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 8,0), acrescentando-se 200 µL de DTNB (reagente de Ellman) 2,525 mM. Após homogeneização, a leitura foi feita a 412 nm, em um tempo máximo de 2 min e expressa em mmol/L (BEUTLER, DURON e KELLY, 1963).

4.6.7.5 Determinação da atividade da catalase (CAT)

Para este teste 100 µL do homogenato do tecido foram adicionados a 1 mL do tampão fosfato (10 mM, pH 7,0) e 400 µL de H₂O₂ 2 mM. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de ácido acético dicromato (dicromato de potássio 5% e ácido acético glacial, 1:3), determinada a 620 nm e expressa em U/mg proteína (BEUTLER, DURON e KELLY, 1963).

4.6.7.6 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Para a avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase foram utilizados 1000 µL do meio de reação xantina/citocromo C; 20 a 40 µL (quantidade a ser determinada na leitura do branco) de uma solução xantina oxidase (0,2 U/mL) e

20 µL da amostra (homogenato de fígado). Para o branco da reação foi utilizado 1 mL do meio de reação, e quantidades crescentes de xantina oxidase diluída (usualmente entre 20 e 40 µL). O branco é aquele que o delta de absorbância está entre 0,015 e 0,020. A atividade da SOD foi determinada a 550 nm, após 5 min de corrida, calculando-se a concentração de SOD em unidades internacionais (U) - 1 unidade internacional de SOD corresponde à quantidade de enzima que inibe 50% da produção de superóxido (MCCORD e FRIDOVICH, 1969).

4.6.7.7 Determinação da atividade glutatona peroxidase (GPx)

Para a GPx foram utilizados 10 µL do homogenato de fígado, o qual foi novamente diluído em tampão Na^+/K^+ (0,05 M, pH 7,0) (1:50), 10 µL de terc-butila 5 mM, e 1000 µL do meio de reação, que consiste em tampão Na/K (0,1 M, pH 7,0); EDTA (5 mM, pH 7,0); NADPH; glutatona redutase; glutatona reduzida e H_2O Milli-Q. A reação baseia-se na oxidação do peróxido-*t*-butil pelo NADP. A leitura foi feita por 5 minutos em 340 nm em 30 °C (BEUTLER, DURON e KELLY, 1963).

4.6.7.8 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT)

Os níveis de SRAT foram determinados de acordo com o método de Yagi (1982). O sobrenadante do homogenato (1 mL) foi misturado com 1,2 mL de 15% TCA/0,73% TBA. Depois de 1 h a 100 °C, as amostras foram resfriadas (20 min) e centrifugadas (980 g/4°C/10 min); as absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas em 535 nm, e a concentração de SRAT expressas em µmol/L.

4.6.7.9 Avaliação histopatológica do fígado

Fragmentos do fígado fixados em formol tamponado neutro a 10% foram embebidos em parafina e seccionados em 4-5 µm, e corados com hematoxilina e

eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico para verificar a presença de danos hepáticos em todos os grupos avaliados (BRITO, 2009).

4.6.8 Toxicidade Aguda

Para o ensaio de toxicidade aguda os animais, camundongos machos e fêmeas, foram selecionados randomicamente e divididos em 3 grupos teste ($n = 20$) e um grupo controle ($n = 10$) para cada extrato testado (etanólico e aquoso). Eles foram submetidos a jejum de sólidos com água *ad libitum*, durante 13 h (10 h anteriores e 3 h posteriores ao tratamento), conforme recomendado pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) (2001). Os animais receberam o extrato testado por gavagem (v.o.) em dose única nas doses de 50, 300 e 2000 mg/kg conforme recomendação da OECD.

Após a administração, os animais foram observados quanto à aparência geral por um período de duas horas para verificação de qualquer comportamento anormal, o que foi avaliado também durante os quatorze dias de experimento. O peso dos animais foi avaliado no primeiro dia antes da administração do extrato e a cada 2 dias até o final dos 14 dias de observação. Registrou-se o número de animais mortos para o cálculo da Dose Letal 50% (LAPA *et al.*, 2008).

Ao término dos 14 dias os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) e xylasina (16 mg/kg), para coleta de sangue para a determinação dos parâmetros bioquímicos, e eutanasiados para retirada do estômago, fígado e rins para avaliação histológica.

Os resultados são expressos por média e desvio padrão e analisados pelo teste de ANOVA seguidos pelo teste de Tukey para comparação de grupos ($p < 0,05$).

4.6.8.1 Análises bioquímicas

Como parâmetros bioquímicos foram analisados glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol - HDL, uréia, aspartato aminotransferase (AST), alanina

aminotransferase (ALT) e proteínas totais através de métodos colorimétricos medidos por espectrofotometria utilizando kits comerciais (Labtest®), de acordo com as instruções do fabricante, e equipamento automatizado Cobas-Mira (Roche®).

4.6.8.2 Análise histopatológica

Para a realização das análises histológicas, os órgãos retirados (estômago, fígado e rins) foram fixados em formalina 10% e as lâminas histológicas confeccionadas no Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR. A visualização e análise das células foram feitas através de microscopia óptica, utilizando-se os corantes hematoxilina-eosina. Os órgãos dos animais testes foram comparados com as lâminas dos grupos controles.

4.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

4.7.1 Cultura e Viabilidade Celular

Células de macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foram cultivadas em meio de cultura DMEM com 5% de soro fetal bovino em estufa a 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂. Para viabilidade celular realizou-se o teste de exclusão celular do corante vital *trypan blue* em equipamento Vi-cell Beckman Coulter®, após 18 h de incubação com os extratos (100 µg/mL) e compostos (50 µg/mL) (WEN *et al.*, 2011).

4.7.2 Verificação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO pelas células RAW 264.7 foi verificada através da quantificação de nitrito no sobrenadante das culturas cultivadas na presença dos

extratos e frações de *R. induta*. As células foram preparadas em placas de 96 poços ($1,12 \times 10^6$ células/mL) as quais foram incubadas, em um primeiro momento, com as amostras nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL e estimuladas 16 h com LPS (lipopolissacarídeo, Sigma® DO819) a 200 ng/mL e co-estimuladas com LPS (200 ng/mL) e Interferon gama (20 U/mL), os quais foram adicionados 2 h após os extratos. As amostras foram solubilizadas em DMSO em quantidade suficiente para não ultrapassar 1% de DMSO na concentração final. As placas foram incubadas por 16 h em estufa a 37 °C, 5% de CO₂. Após este período o sobrenadante foi retirado para a dosagem de nitrito.

A 100 µL de sobrenadante foram adicionados 120 µL de reagente de Griess, uma mistura v/v de uma solução aminobenzeno sulfonamida 1% em ácido acético 30%, e naftil etileno diamida 0,1% em ácido acético 60%. Uma curva padrão foi feita com NaNO₂ nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 nmol. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices® Spectra MaxPlus 384) em 543 nm, calculando-se a concentração de nitrito em µM através da fórmula a seguir (CHO *et al.*, 2000; PROMEGA, 2009):

$$\mu\text{M} = (\text{concentração lida} / \text{volume de sobrenadante}) \times 1000$$

Com as amostras que apresentaram uma maior redução da produção de nitrito realizou-se uma cinética de tempo, para a qual se utilizou a concentração de 100 µg/mL verificando-se a dosagem de nitrito a 16, 24 e 48 h de estimulação com LPS e LPS/IF-γ. Através da cinética se encontrou o melhor tempo de estimulação das células. Com essas amostras foram feitos três experimentos independentes em triplicata para análise estatística dos resultados. Os resultados são expressos como média e desvio padrão e tratados estatisticamente por ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os compostos isolados testados, provenientes da fração com maior atividade inibitória na produção de nitrito, foram preparados nas concentrações de 50 e 10 µg/mL, seguindo-se o mesmo protocolo utilizado para os extratos.

4.7.3 Verificação da Produção de TNF- α

Células RAW 264.7 foram cultivadas da mesma maneira descrita no item 4.7.1, as quais foram incubadas com os extratos e frações na dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ por 2 h e depois estimuladas com LPS 200 ng/mL por 5 h e 16 h. Percorrido o tempo de incubação retirou-se o sobrenadante, e dosou-se a quantidade de TNF- α em Kit Elisa (Thermo Scientific®), de acordo com o protocolo do fabricante (WEN *et al.*, 2011). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e tratados estatisticamente pelo teste ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.8.1 Triagem *in vitro* de Atividade Tripanocida e Leishmanicida

A atividade tripanocida e leishmanicida foi avaliada pelo método do MTT, de acordo com Sieuwerts *et al.* (1995). Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* linhagem Y (5×10^6 parasitas/mL) e formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* linhagem H3 (3×10^6 parasitas/mL) foram cultivadas em meio LIT (*liver infusion tryptose*) e Schenider, respectivamente, e semeadas em placas de 96 poços. As amostras (extratos e frações) foram preparadas em diferentes concentrações (1000, 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$) a partir de uma solução mãe de 25 mg/mL solubilizadas em DMSO. Em cada poço foram colocados 20 μL da amostra e 180 μL da suspensão de parasitas. Incubaram-se as placas por 48 h a 27 °C, as quais, após este tempo, foram avaliadas em microscópio invertido para visualização dos parasitas. Depois da análise visual foram adicionados 50 μL de MTT em cada poço nas concentrações de 10 mg/mL para *T. cruzi* e 2 mg/mL para *L. braziliensis*, e foram novamente incubadas a 27 °C por 6 h e 4 h, respectivamente. Decorrido o tempo centrifugaram-se as placas a 1700 rpm por 10 min, removeu-se o sobrenadante e acrescentaram-se 100 μL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan.

A densidade óptica foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas (TECAN® modelo Infinite M2000), e calculou-se a concentração inibitória de 50%

(CI_{50}) para cada amostra em programa estatístico Instat. Como controle negativo foi utilizado DMSO 1%, e como controles positivos benzonidazol 10 μ M para *T. cruzi* e anfotericina B 0,1 μ M para *L. braziliensis*.

4.8.1.2 Citotoxicidade sobre células J774.A1

O teste de citotoxicidade é necessário para a verificação do índice de seletividade das amostras entre os parasitas e células normais do hospedeiro.

A citotoxicidade sobre as células de macrófagos J774.A1 foi avaliada pelo método do MTT. Após raspagem das células no frasco de cultivo elas foram suspensas em meio DMEM fazendo-se a contagem em câmara de Neubauer para ajustar a concentração de 2×10^5 células/mL. A seguir 180 μ L/poço da suspensão foram distribuídos em placa de 96 poços e as células incubadas a 37 °C e atmosfera de 5% de CO_2 por 24 h. Decorrido o tempo retirou-se o meio, lavou-se as células com PBS e adicionaram-se 180 μ L de meio DMEM em cada poço. As amostras, preparadas em DMSO nas concentrações de 1000, 500, 100, 40 e 8 μ g/mL, foram acrescentadas nos poços (20 μ L) e as placas incubadas por 48 h a 37 °C e 5% CO_2 .

Para avaliação da citotoxicidade o meio das células foi removido e adicionaram-se 50 μ L de MTT (1 mg/mL) em cada poço incubando-se novamente as células por 4 h. O MTT foi removido, acrescentou-se 100 μ L de DMSO e fez-se a leitura em leitor de placas (TECAN® modelo Infinite M2000), calculando-se então a concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) a partir da qual foi possível calcular o índice de seletividade (CC_{50}/CI_{50}) (Sieuwerds *et al.*, 1995).

4.8.2 Atividade Antifúngica

A atividade das amostras frente a diferentes linhagens de fungos foi avaliada pelo método da concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002).

4.8.2.1 Preparo do inóculo

As colônias dos fungos foram retiradas dos tubos de crescimento e preparadas soluções salinas das linhagens, equivalentes ao tubo 0,5 da escala de Macfarland, as quais foram diluídas em meio RPMI. Para os fungos filamentosos, utilizou-se uma diluição de 1:20 em RPMI, e para as leveduras foi realizada uma diluição em duas etapas, primeiro uma diluição 1:100 em RPMI, a qual foi diluída em RPMI 1:20.

4.8.2.2 Preparo do teste

Cada extrato foi testado em duplicata sobre linhagens das leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), e do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* (KC692747). Como controles positivos utilizou-se itraconazol (16 µg/mL) e fluconazol (64 µg/mL).

Uma solução mãe das amostras foi preparada na concentração de 40 mg/mL em DMSO para os extratos brutos e 5,12 mg/mL para as frações e compostos, a quantidade do DMSO utilizada não pode ser superior a 5% do volume total de solução no poço da placa teste e deve ser suspensa em meio RPMI. Nas placas foram distribuídos 100 µL de RPMI em todos os poços. Na primeira coluna adicionaram-se 10 µL da amostra e 90 µL de RPMI, depois foram realizadas as diluições seriadas. A microdiluição seriada foi feita reduzindo-se sempre à metade a concentração contida no primeiro poço, e estendeu-se até a 10^a coluna da placa de 96 poços. Os 100 µL residuais do último poço da diluição foram descartados e depois distribuiu-se 100 µL da suspensão fúngica preparada sobre a placa até a 11^a coluna. A última coluna é o controle de esterilidade do meio. As placas de microdiluição foram incubadas em estufa à temperatura de 37 °C. A leitura foi feita após 18h para *C. albicans* e *A. fumigatus*, e após 48 h para *C. parapsilosis*. Os extratos brutos foram testados a partir de uma concentração inicial de 1000 µg/mL e as frações a partir de 128 µg/mL.

4.8.3 Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada pelo método da concentração inibitória mínima de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2009) e Ayres *et al.* (2008).

4.8.3.1 Preparo do inóculo

Quatro linhagens foram utilizadas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Os inóculos foram preparados em solução salina estéril (0,85%) na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de Mac Farland.

4.8.3.2 Preparo do teste

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços. Uma solução mãe dos extratos foi preparada na concentração de 100 mg/mL, e para as frações uma solução de 20 mg/mL, as quais foram filtradas em membrana Millipore de 0,22 μ m. Após a filtração preparou-se uma solução na concentração de 10000 μ g/mL e 400 μ g/mL de cada extrato e fração a ser testado. Em seguida transferiu-se 100 μ L de caldo Mueller-Hinton (Merck®) em todos os poços, no primeiro poço da placa foi inoculado 100 μ L da amostra realizando-se uma diluição seriada nos poços até a coluna 9, obtendo-se concentrações de 5000 μ g/mL a 39 μ g/mL para os extratos; e de 200 μ g/mL a 1,5 μ g/mL para as frações. Após as diluições acrescentou-se 5 μ L do inóculo bacteriano.

Uma coluna da placa foi reservada para o controle de esterilidade (caldo + amostra), duas para controle negativo dos solventes utilizados para diluir as amostras, uma com etanol, caldo e inóculo; e outra com DMSO, caldo e inóculo; e

uma coluna para o controle positivo, que continha o meio de cultura e o inóculo para verificar a viabilidade da cepa.

As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 16 - 20 h. Após este tempo foram acrescentados 20 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium, MERCK®) a 0,5% em todos os poços e as placas foram reincubadas por mais 3 h a 35 °C. Para leitura dos resultados a presença da coloração vermelha é indicativa de inatividade da amostra frente ao crescimento da cepa. Cada teste foi realizado em duplicata.

4.9 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

4.9.1 Citotoxicidade Sobre Células KB e MRC5

As células KB de carcinoma cervical uterino (ATCC CCL-17) e MRC5, fibroblastos de tecido pulmonar, foram colocadas em garrafas de 75 cm³ e repicadas duas vezes por semana para renovação do estoque e colocadas em estufa a 37 °C com uma atmosfera de 95% de ar e 5% de dióxido de carbono.

Uma contagem de células a partir do repique, recuperadas pela utilização de tripsina e lavadas com PBS, foi efetuada na câmara de Neubauer, depois se preparou uma diluição a fim de se obter 75000 células por poço, utilizando-se placas de 96 poços. Depois de 24h cada concentração dos extratos (10 µg/mL) foi colocada nos poços em triplicata, bem como os controles do solvente e docetaxel. As amostras foram solubilizadas em DMSO.

Após 3 dias o crescimento celular foi avaliado por comparação com as culturas controles com a adição de 40 µL de MTS que se fixa nas mitocôndrias das células vivas. Este é reduzido desenvolvendo uma coloração que absorve em 490 nm. Após 2 h de incubação a densidade óptica de cada poço foi medida em leitor de microplacas. Determinou-se a porcentagem de inibição de cada amostra conforme a fórmula abaixo (TEMPÊTE *et al.*, 1995).

$$\% \text{inibição} = (1 - (\text{D.O. amostra} / \text{D.O. controle})) \times 100$$

4.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A atividade hemolítica foi analisada por dois métodos: hemólise em tubo e hemólise por difusão em placa de ágar sangue, os quais são descritos a seguir.

4.10.1 Hemólise em Tubo

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998) e Carvalho *et al.* (2007). Neste teste foram testados o extrato bruto etanólico, as quatro frações obtidas deste extrato e o extrato aquoso.

Uma suspensão a 2% de hemácias de carneiro (Newprov®) foi preparada em solução tampão fosfato pH 7,4. As amostras foram preparadas nas concentrações de 1000, 500, 200 e 100 µg/mL utilizando etanol 10% em solução salina como solvente. As amostras (1 mL) foram adicionadas a 1 mL da suspensão de hemácias, homogeneizadas lentamente e deixadas em repouso por 30 min. Após este tempo os tubos foram novamente agitados, deixados em repouso por mais 150 min, e depois centrifugados por 5 min a 1500 rpm. Um controle positivo com água destilada foi preparado, assim como um controle negativo com o solvente utilizado. O resultado foi expresso como presença ou ausência de hemólise de acordo com a coloração do sobrenadante após a centrifugação. A presença de um precipitado de hemácias no fundo do tubo indica um resultado negativo.

4.10.2 Hemólise por Difusão em Ágar Sangue

Neste método as amostras foram preparadas e impregnadas em discos de papel estéreis (Whatmann nº1, diâmetro de 7 mm) na concentração de 1000 µg. Após evaporação do solvente os discos foram distribuídos em placas de ágar

sangue de carneiro (Newprov®), as quais foram incubadas a 36 °C por 24 h. Decorrido este período os halos hemolíticos foram medidos e o resultado expresso como a média dos halos na duplicata do teste. Discos com solvente foram usados como controle negativo e discos com Triton X-100 (1000 µg) como controle positivo (EFING, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal obtido, folhas de *Rourea induta*, apresentou umidade de 9,14%, estando dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (2010) de 8 a 14%. Uma quantidade excessiva de água pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos e hidrólise de compostos, o que pode deteriorar o material.

Para cinzas totais obteve-se um valor de 5,24%, o que representa o total de substâncias inorgânicas não voláteis no processo de incineração, como magnésio, cálcio, potássio, ferro, sódio, estando dentro do limite de 15% da farmacopeia. Quantidades maiores de cinzas podem corresponder a materiais inorgânicos de origem externa podendo configurar falsificação do vegetal, sendo este um teste importante no controle de qualidade de drogas vegetais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

5.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES

Após a extração do material vegetal (2,3 kg) em Soxhlet e fracionamento foram obtidas quatro frações: hexano, clorofórmio, acetato de etila e residual, o rendimento está apresentado na tabela 4. O extrato bruto apresentou um resíduo sólido de 10,52% ou 272 mg/mL de extrato.

Tabela 4 – Rendimento do extrato etanólico

Fração	Massa seca obtida (g)	Rendimento (%) em relação à massa inicial
Hexano	25,06	1,09
Clorofórmio	23,74	1,032
Acetato de etila	28,13	1,22
Residual	107,82	4,69

O extrato aquoso foi obtido a partir de 400 g de material vegetal, e após liofilização foram obtidos 54,477 g do extrato seco, o que representa um rendimento de 13,62%.

Após a filtração de 100 mg de cada extrato e fração, separadamente, em membrana de poliamida foram obtidos 37,3 mg da fração acetato de etila, 52,9 mg da clorofórmio, 15,8 mg da fração residual, 28 mg do extrato bruto etanólico e 12,9 mg do extrato aquoso.

5.3 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

5.3.1 Fração Acetato de Etila

No fracionamento da fração acetato de etila em coluna de sílica foram coletadas 49 frações, as quais foram reunidas em 8 frações de acordo com a similaridade de composição revelada por cromatografia em camada delgada (CCD), resultando nas frações AC1-24 (13,96 mg), AC25-26 (6,51 mg), AC27 (7,14 mg), AC28-29 (34,15 mg), AC30-33 (66,18 mg), AC34-35 (25,85 mg), AC36-37 (422,16 mg) e AC38-49 (8,30 mg).

As frações AC25-26 e AC28-29 se apresentaram puras no perfil observado em CLAE analítica e RMN-¹H. A fração AC25-26 após comparação com dados da literatura foi identificada como o flavonoide quercetina já isolado para esta espécie (KALEGARI et al., 2011). A fração AC28-29 (34,15 mg) se apresentou como outro composto ainda não identificado nesta espécie, sendo então submetida aos métodos de elucidação estrutural. A fração AC27 apresentou uma mistura dos compostos de AC25-26 e AC28-29.

As demais frações foram submetidas a CLAE analítica para verificação do perfil cromatográfico, porém todas apresentaram uma mistura de compostos, sendo necessária a realização de uma purificação por CLAE preparativa.

Da fração AC30-33 (57 mg), após procedimento de CLAE preparativa, três picos majoritários foram coletados (figura 2), porém foi possível apenas a identificação do primeiro, o qual foi denominado AC30-33-1 (2,2 mg).

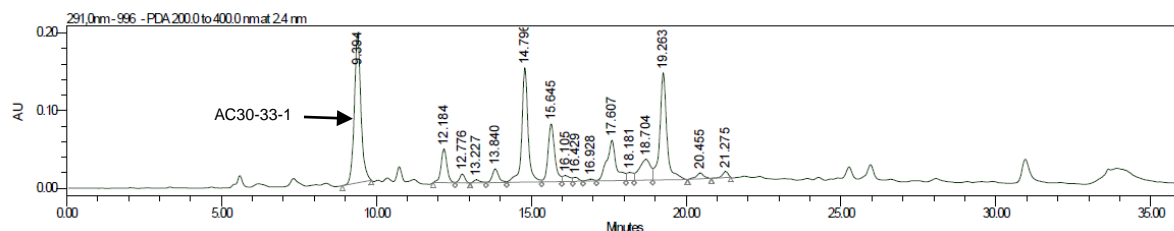


Figura 2 – Cromatograma de CLAE preparativa da fração AC30-33

Para a fração AC34-35 (12,8 mg) dois picos foram coletados da CLAE preparativa, denominados AC34-35-2 (1,5 mg) e AC34-35-3 (0,6 mg) (figura 3). Os dois foram submetidos às análises de identificação. O composto AC34-35-3 foi identificado, por comparação com a literatura, como um dos flavonoides já isolados nesta espécie, a quercetina 3-O- α -arabinofuranosídeo, e o composto AC34-35-2 não se apresentou puro, o que levou a uma segunda purificação. Para este processo fez-se uso do mesmo gradiente de fase móvel utilizado na cromatografia preparativa, porém foi realizada uma separação em CLAE analítica, com coluna Sunfire® C18 (5 μ m, 3,0x150 mm) e fluxo de 0,7 mL/min devido a quantidade do composto disponível (1,5 mg). Após este procedimento obteve-se 0,7 mg do composto puro denominado AC34-35-2 (figura 4).

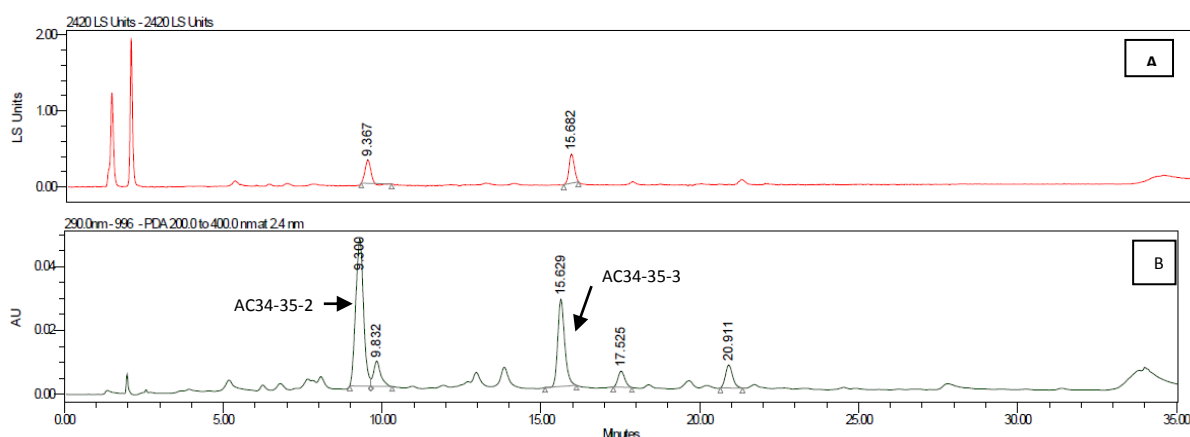


Figura 3 – Cromatograma de CLAE preparativa da fração AC34-35: A: detector DEDL; B: detector UV

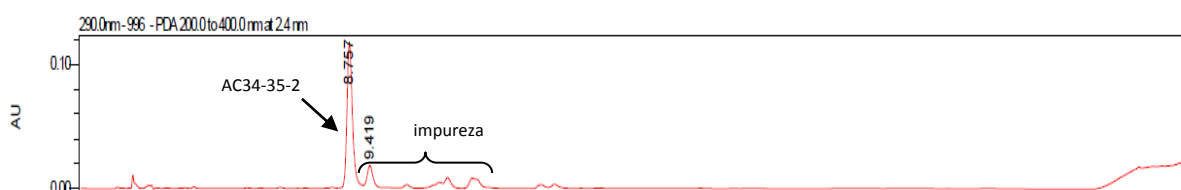


Figura 4 – Cromatograma de CLAE analítica para purificação do composto AC34-35-2

A purificação em CLAE preparativa da fração AC36-37 (86 mg) levou a coleta de 5 picos (figura 5), AC36-37-1 (9,05 mg), AC36-37-2 (4,7 mg), AC36-37-3 (4,3 mg), AC36-37-4 (2,7 mg), AC36-37-5 (3,1 mg). Todos os compostos se apresentaram puros no espectro de RMN- ^1H , com o qual foi possível identificar os compostos AC36-37-1, AC36-37-3 e AC36-37-5 como os flavonoides hiperina, quercetina-3-O- β -xilosídeo e quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo, respectivamente, já identificados na espécie (KALEGARI *et al.*, 2011). Os compostos AC36-37-2 e AC36-37-4 apresentaram características comuns aos compostos já identificados, mas com algumas diferenças na região do glicosídeo, portanto estes foram submetidos às análises de identificação.

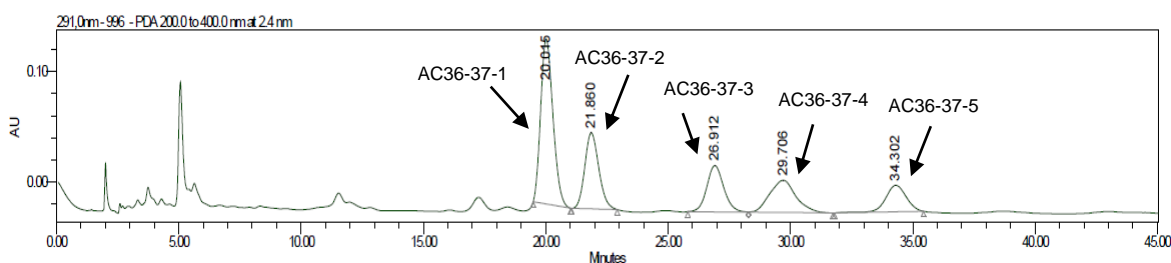


Figura 5 – Cromatograma de CLAE preparativa da fração AC36-37

5.3.2 Extrato aquoso

O fracionamento do extrato aquoso por cromatografia flash em coluna C18 resultou em 47 frações, as quais foram submetidas à CLAE analítica. Os cromatogramas revelaram que após a fração 16 não havia muitos compostos, as quais foram reunidas em uma única fração EAS17-43 (10,0 mg), assim como nas frações 1, 2 e 3. Para as demais frações foi identificado um perfil diferente em cada uma, o que levou ao não agrupamento das mesmas, obtendo-se 13 frações diferentes EAS4 (87,0 mg), EAS5 (10,9 mg), EAS6 (6,6 mg), EAS7 (14,0 mg), EAS8 (8,2 mg), EAS9 (10,4 mg), EAS10 (17,9 mg), EAS11 (37,5 mg), EAS12 (41,9 mg), EAS13 (37,7 mg), EAS14 (24,5 mg), EAS15 (11,1 mg), EAS16 (5,3 mg).

A fração EAS7 (14 mg) foi submetida à CLAE preparativa e deu origem a dois compostos EAS7-1 (1,2 mg) e EAS7-2 (1,5 mg) (figura 6). O segundo composto mostrou-se puro no RMN- ^1H , e o primeiro apresentou uma pequena mistura, mas como sua estrutura é muito semelhante ao segundo foi possível identificá-lo.

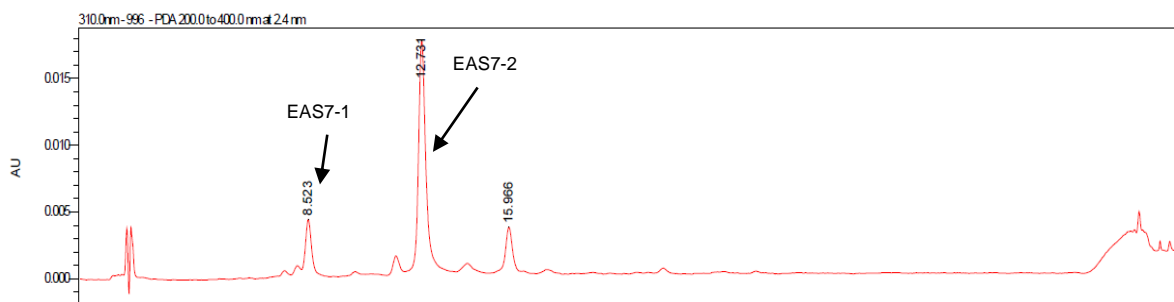


Figura 6 – Cromatograma de CLAE preparativa da fração EAS7

Na CLAE preparativa da fração EAS12 (41 mg) obtiveram-se 5 picos coletados, EAS12-1 (1,9 mg), EAS12-2 (2,3 mg), EAS12-3 (2,3 mg), EAS12-4 (3,7 mg) e EAS12-5 (1,3 mg) (figura 7). Desses somente os picos EAS12-2 e EAS12-3 mostraram-se puros no espectro de RMN- ^1H , sendo o composto EAS12-2 idêntico ao composto isolado na fração acetato de etila AC28-29, e o composto EAS12-3 (2,3 mg) um composto diferente dos demais já identificados, o qual foi submetido às análises de identificação.

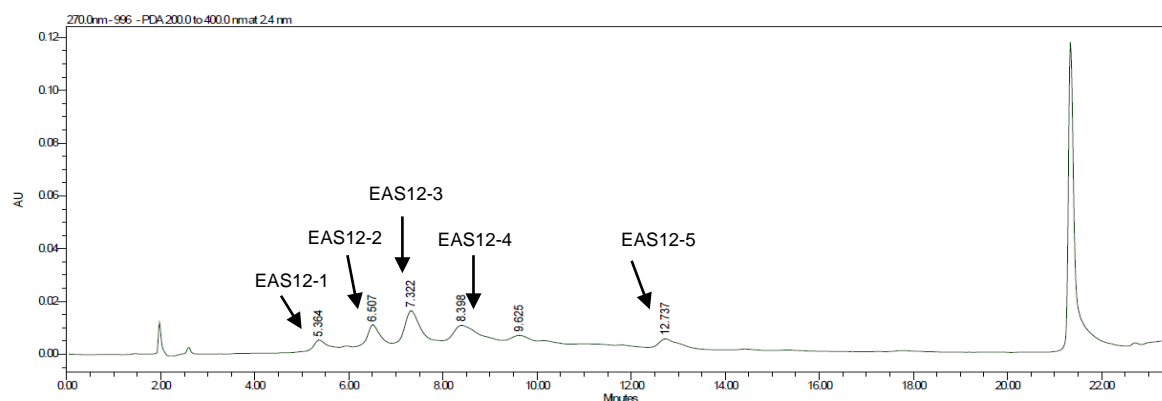


Figura 7 – Cromatograma de CLAE preparativa da fração EAS12

5.3.3 Fração Clorofórmio Filtrada em Membrana de Poliamida

A fração clorofórmio submetida ao processo de filtração por membrana de poliamida apresentou uma mudança no perfil encontrado em CLAE após a filtração. As duas amostras (1 mg/mL), antes e depois da filtração, foram submetidas ao mesmo gradiente e condições de corrida, cujos perfis podem ser observados nas figuras 8 e 9.

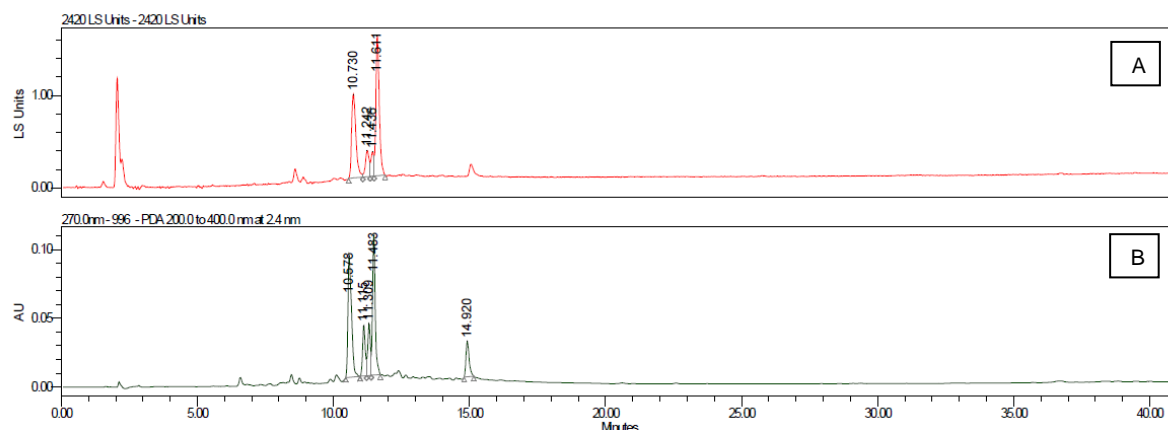


Figura 8 – Perfil em CLAE da fração clorofórmio: **A:** detector DEDL; **B:** detector UV

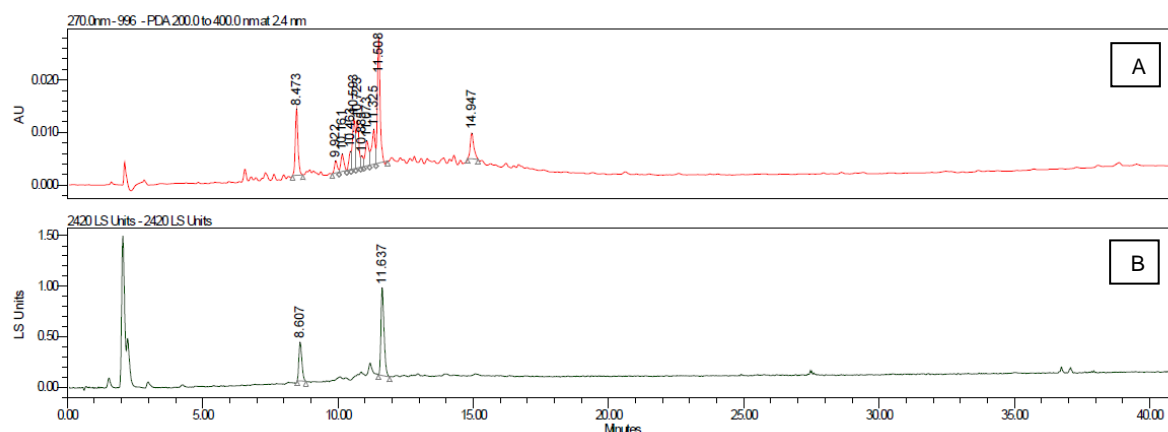


Figura 9 – Perfil em CLAE da fração clorofórmio filtrada em membrana de poliamida
A: detector DEDL; **B:** detector UV

Analisando os perfis cromatográficos percebe-se que os polifenóis majoritários na fração original clorofórmio não foram totalmente eliminados, porém se apresentam em quantidades bem menores, sendo possível observar outros compostos na fração que antes eram minoritários devido à presença de grande quantidade de polifenóis. Observa-se que o composto que elui em torno de 8 min na fração filtrada não era muito evidente antes da filtração, o qual se tornou um dos majoritários, junto com o composto eluído em 11 min que já aparecia.

Portanto, a fração filtrada em membrana de poliamida foi submetida à CLAE preparativa para isolamento do composto em 8 minutos, de onde foram recuperados 3,5 mg do composto em questão o qual foi denominado CP1 (figura 10). O restante da fração foi reunida e denominada CPF.

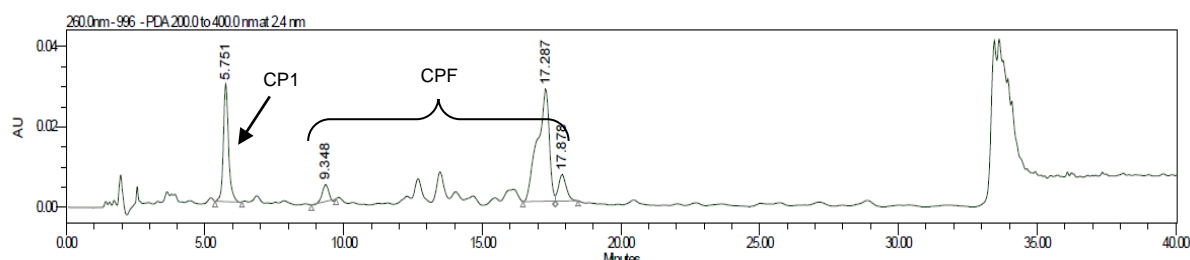


Figura 10 – Cromatograma de CLAE preparativa da fração clorofórmio filtrada em membrana de poliamida

A repurificação do composto CP1 em CLAE analítica levou ao isolamento de 3 compostos puros, CP1-1 (1,0 mg), CP1-2 (1,0 mg) e CP1-3 (0,5 mg), os quais foram submetidos às análises de identificação (figura 11).

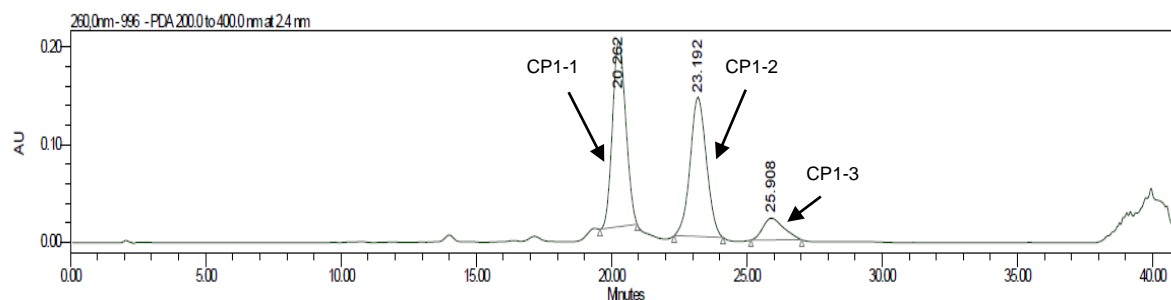


Figura 11 – Cromatograma de separação em CLAE analítica da fração CP1

Na purificação da fração CPF em CLAE preparativa foi possível a coleta de um pico majoritário ao DEDL (figura 12), o qual após verificação em RMN- ^1H não se apresentou puro sendo necessária então uma nova purificação em CLAE analítica.

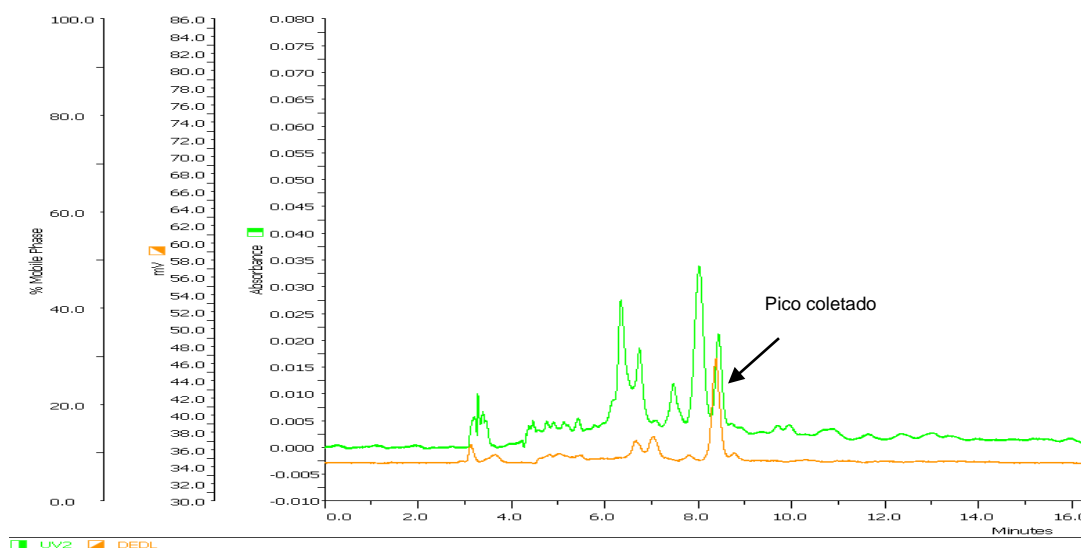


Figura 12 – Cromatograma de separação em CLAE preparativa da fração CPF

De 1,5 mg do pico coletado três compostos foram recuperados, CPF-1 (0,9 mg), CPF-2 (0,5 mg), CPF-3 (0,3 mg) (figura 13).

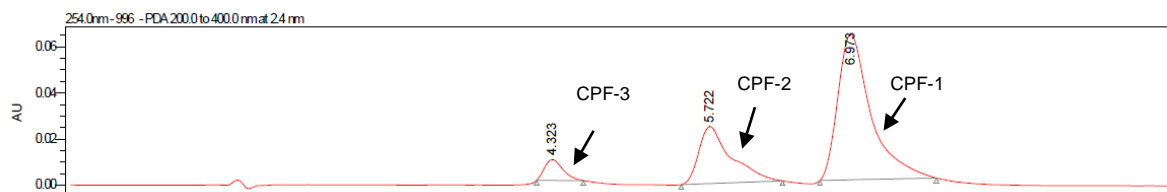


Figura 13 – Cromatograma de separação em CLAE analítica do pico coletado na fração CPF

Os compostos CPF-1 e CPF-2 se apresentaram puros no RMN-¹H, para os quais foram feitos todos os procedimentos de identificação. Já o composto CPF-3 não estava puro e devido a pouca quantidade não foi identificado.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

5.4.1 Compostos Isolados

Neste estudo foram isolados, pela primeira vez na espécie, 13 substâncias puras, os quais estão listados na tabela 5 a seguir de acordo com os seus códigos e origem.

Tabela 5 – Relação dos compostos isolados de *Rourea induta*

Código	Fração de origem	Quantidade (mg)	Nome
AC29-28	AC	34,15	Epicatequina
AC36-37-2	AC	4,7	Isoquercetrina
AC36-37-4	AC	2,7	Guaijaverina
AC30-33-1	AC	2,2	Procianidina B2
EAS12-3	EA	2,3	Procianidina C1
EAS7-2	EA	1,5	Ácido clorogênico
EAS7-1	EA	1,2	Ácido neoclorogênico
AC34-35-2	AC	0,7	Éster metílico do ácido neoclorogênico
CP1-1	CLORP	1,0	(6S,9S)-roseosideo
CP1-2	CLORP	1,0	(6S,9R)-roseosideo
CPF-1	CLORP	0,9	(6R,9R)-byzantiosideo B
CPF-2	CLORP	0,5	(6R,9S)-blumenol C glucosideo
CP1-3	CLORP	0,5	Citrosideo A

AC = acetato de etila, EA = extrato aquoso, CLORP = clorofórmio filtrada em membrana de poliamida.

5.4.2 Flavonoides

5.4.2.1 AC28-29

O composto AC28-29 (34,15 mg) foi isolado como um pó amarelo amorfo. Os deslocamentos químicos de RMN-¹H e RMN-¹³C, obtidos em 300 MHz e 75,47 MHz, respectivamente, em CD₃OD, mostraram 15 sinais de carbonos indicando a presença de um esqueleto flavonoídico, e os hidrogênios na região de 6-8 ppm confirmaram a presença de um anel aromático (tabela 5).

Os hidrogênios aromáticos em δ 6,97 (H2') com $J = 1,7$ Hz, δ 6,76 (H5') com $J = 8,1$ Hz, e δ 6,80 com $J = 8,3$ e $1,7$ Hz (H6') indicam acoplamento meta entre H2' e H6', e acoplamento orto entre H5' e H6', caracterizando um anel aromático trissubstituído. Nesta região também se observou os dubletos referentes aos hidrogênios H6 (δ 5,94) com $J = 2,4$ Hz e H8 (δ 5,91) caracterizando um acoplamento meta de um anel aromático, os quais correspondem ao anel A do flavonoide substituído em C-5 e C-7. Os prótons em δ 2,73 e δ 2,86 correspondem a um mesmo carbono indicando um CH₂ em C-4, os quais acoplam com o hidrogênio em δ 4,18 (figuras 14 e 15).

Tabela 6 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN-¹H e RMN-¹³C do composto AC28-29

Posição	Experimental		NOMIZU <i>et al.</i> (2008)	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
2	4,81 (s, 1H)	80,0	4,81 (s)	79,8
3	4,18 (m, 1H)	67,6	-	67,5
4	2,73 (dd, 1H, $J = 16,9$ e $3,0$) 2,86 (dd, 1H, $J = 16,9$ e $4,5$)	29,4	2,73 (dd, $J = 17,0$ e $3,0$) 2,85 (dd, $J = 17,0$ e $5,0$)	29,2
5	-	157,8	-	157,7
6	5,94 (d, 1H, $J = 2,4$)	96,5	5,94 (d, $J = 2,6$)	96,4
7	-	158,1	-	158,0
8	5,91 (s, 1H)	96,0	5,91 (d, $J = 2,5$)	95,9
9	-	157,5	-	157,4
10	-	100,2	-	100,1
1'	-	132,4	-	132,3
2'	6,97 (d, 1H, $J = 1,7$)	115,4	6,97 (d, $J = 2,0$)	115,3
3'	-	145,9	-	146,1
4'	-	146,1	-	146,1
5'	6,76 (d, 1H, $J = 8,1$)	116,0	6,75 (d, $J = 7,5$)	115,9
6'	6,80 (dd, 1H, $J = 8,3$ e $1,7$)	119,5	6,79 (dd, $J = 8,5$ e $1,5$)	119,4

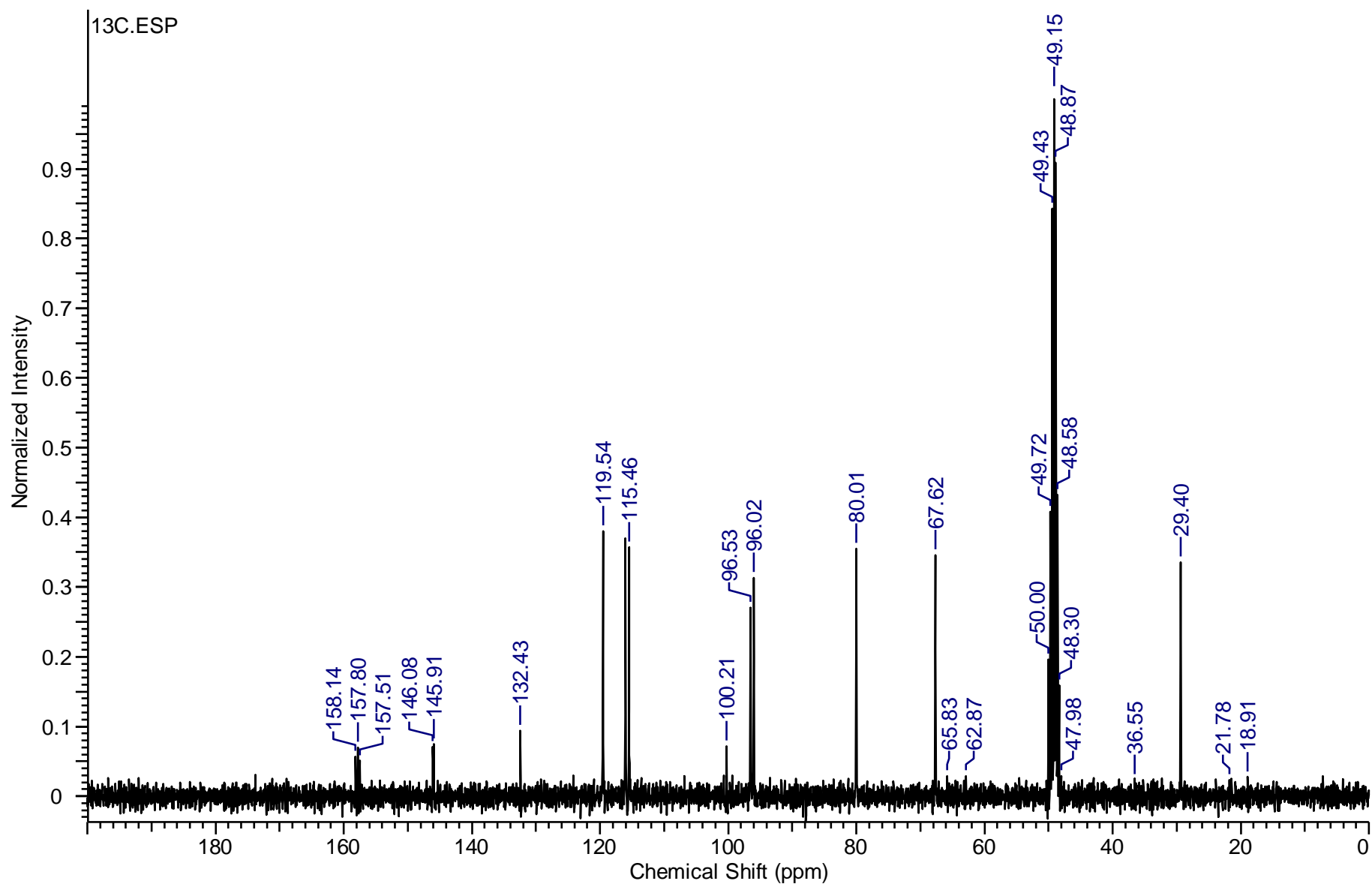


Figura 14 – Espectro RMN-¹³C do composto AC28-29 em CD₃OD a 75,47 MHz e 25 °C

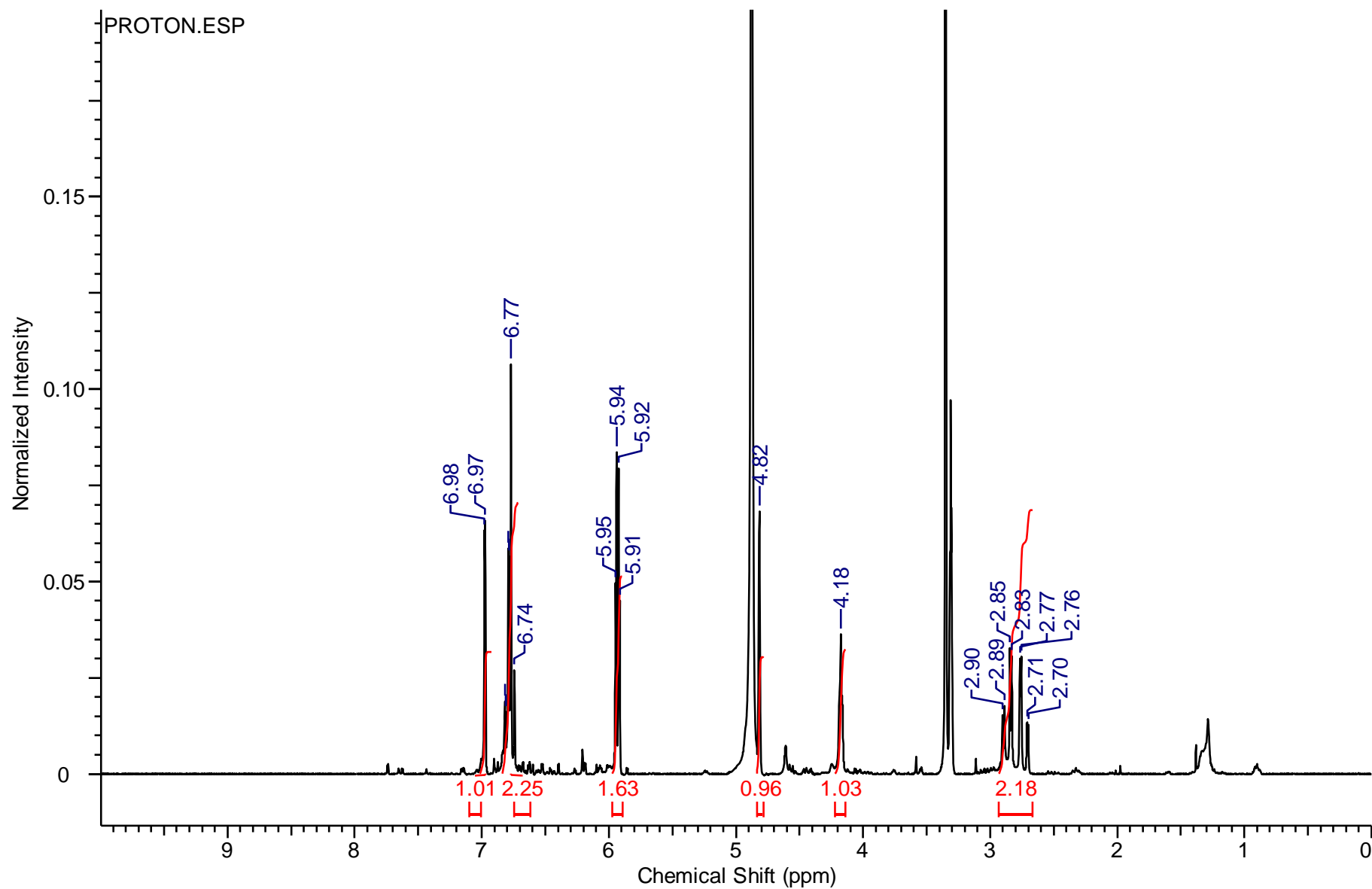


Figura 15 – Espectro RMN-¹H do composto AC28-29 em CD₃OD a 300 MHz e 25 °C

Para a massa encontrou-se um m/z de 291,2 ($M+H$)⁺ (figura 16) e seu poder rotatório foi medido em $[\alpha]_D^{20} = -38,0^\circ$ (c 0,1 g/100 mL, MeOH), valor correspondente ao encontrado na literatura $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$ (c 0,004, MeOH) (LOPES *et al.*, 2009). Por comparação com dados da literatura foi possível identificar o composto AC28-29 como o flavonoide epicatequina (figura 17) (NOMIZU *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2009; XIANG *et al.*, 2011), o qual foi isolado pela primeira vez nesta espécie e é conhecido como um potente antioxidante, podendo proteger os componentes celulares da oxidação, contribuindo assim para o potencial antioxidante da espécie (NOMIZU *et al.*, 2008).

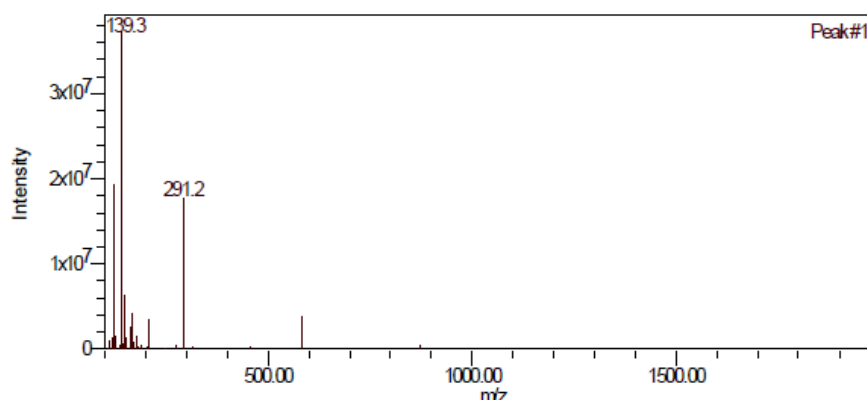


Figura 16 – Espectro de massa (ES+) de AC28-29

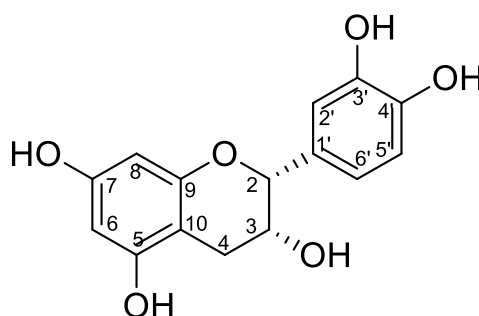


Figura 17 – Estrutura química da epicatequina

5.4.2.2 AC36-37-2

Este composto (4,7 mg) também foi isolado como um pó amarelo amorfo. Os espectros RMN-¹H e RMN-¹³C foram obtidos, respectivamente, à 500 MHz e 125,76 MHz em CD₃OD (tabela 7). Os espectros de RMN-¹³C revelaram a presença dos 15 carbonos característicos da estrutura básica dos flavonoides e seis carbonos entre 60 e 80 ppm, região característica de glicosídeo (figura 20). No espectro de RMN-¹H foram observados os deslocamentos na região de 6-8 ppm referentes aos anéis aromáticos de flavonoides, além de deslocamentos na região de 3-4 ppm, característicos de açúcares, confirmando a presença de uma unidade de açúcar (figura 21).

Os hidrogênios em δ 6,88 (H5') $J = 8,3$ Hz, δ 7,71 (H2') $J = 1,6$ Hz, δ 7,60 (H6') $J = 8,3$ e $1,6$, correspondentes ao anel B, evidenciam acoplamento orto entre H5' e H6', e meta entre H6' e H2'; os prótons em δ 6,21 (H6) $J = 1,6$ Hz e δ 6,40 (H8) $J = 1,6$ Hz correspondentes ao anel A, indicam acoplamento meta entre H6 e H8, comprovando ser um derivado da quercetina. Para o glicosídeo o hidrogênio anomérico está localizado em δ 5,25 com $J = 7,6$ Hz, e os carbonos em δ 104,4 (C1''), δ 78,5 (C5''), δ 78,3 (C3''), δ 75,9 (C2''), δ 71,4 (C4'') e δ 62,7 (C6'') os quais, comparados com dados da literatura, indicam a presença de um grupo β -glucopiranosil, cuja ligação ao carbono 3 foi evidenciada pelo experimento HMBC, que correlaciona o sinal em δ 5,25 (H1'') com o carbono em δ 135,8 (C3) (LEE *et al.*, 2007) (figura 19). A presença deste glicosídeo foi confirmada pelas constantes de acoplamento entre os hidrogênios 1'', 2'', 3'', 4'' e 5'' em torno de 8 Hz, indicando que todos estão em posição axial, comprovando ser uma glucopiranosose.

Tabela 7 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN-¹H e RMN-¹³C do composto AC36-37-2

Posição	¹ H	¹³ C	COSY ^a	NOESY ^a	HMBC (¹ H→ ¹³ C) ^a
2	-	159,2			
3	-	135,8			
4	-	179,7			
5	-	163,2			
6	6,21 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,6)	100,0	H8		C5,C7,C8,C10
7	-	166,2			
8	6,40 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,6)	94,8	H6	H2',H6'	C7,C6, C9,C10
9	-	158,6			
10	-	105,8			
1'	-	123,2			
2'	7,71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,6)	117,7	H6'	H8,H1'',H2''	C2,C1',C3',C4'
3'	-	146,1			
4'	-	150,0			
5'	6,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,3)	116,1	H6'	H6'	C1',C2',C3',C4'
6'	7,60 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,3 e 1,6)	123,4	H2', H5'	H8,H5',H1'',H2''	C2,C2',C4'
Glucopirranose					
1''	5,25 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,6)	104,4	H2''	H2',H6',H2'',H3'', H5''	C3,C5''
2''	3,48 (1H, <i>tl</i> , <i>J</i> = 8,8)	75,9	H1'', H3''	H2',H6',H1'',H5'',H4'',H6''b	C3'',C1''
3''	3,43 (1H, <i>tl</i> , <i>J</i> = 8,8)	78,3	H2''	H1'',H5'',H6''b	C2'',C4''
4''	3,35 (1H, <i>tl</i> , <i>J</i> = 9,3)	71,4	H5''	H2'',H5'',H6''a,H6''b	C3'',C6''
5''	3,22 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,7; 5,4 e 1,6)	78,5	H6''a, H4''	H1'',H2'',H3'',H4'',H6''a,H6''b	C4''
6''	3,71 (1Ha, <i>dd</i> , <i>J</i> = 11,7 e 1,6)	62,7	H5'',6''b	H4'', H5'',H6''b	C4''
	3,58 (1Hb, <i>dd</i> , <i>J</i> = 11,7 e 5,4)		H6''a	H2'',H3'', H4'',H5'',H6''a	C5''

(^a) - Correlações fracas são indicadas em itálico

As correlações carbono-hidrogênio foram estabelecidas pelo experimento HSQC e HMBC, e os acoplamentos entre os hidrogênios pelo COSY e NOESY.

Para o espectro de massa alta resolução obteve-se um *m/z* de 463,0876 [M - H]⁻, C₂₁H₁₉O₁₂⁻, sendo a massa calculada igual a 463,0877 (figura 18). Seu poder rotatório foi medido em [α]_D²⁰ = -15,0° (c 0,1 mg/100 mL, MeOH), semelhante à literatura, onde se tem [α]_D²⁰ = -9,0° (c 1 g/L, MeOH) (BOUKTAIB, ATMANI e ROLANDO, 2002). Por comparação com dados da literatura identificou-se este composto como o flavonoide quercetina-3-O-β-glucopiranosídeo, conhecido como isoquercetrina (figura 22) (GÜVENALP e DEMIREZER, 2005; GUZHVA, 2010). Este composto, isolado pela primeira vez na espécie, contribui para a atividade antioxidante da mesma junto com os demais compostos fenólicos já isolados e identificados nesta espécie.

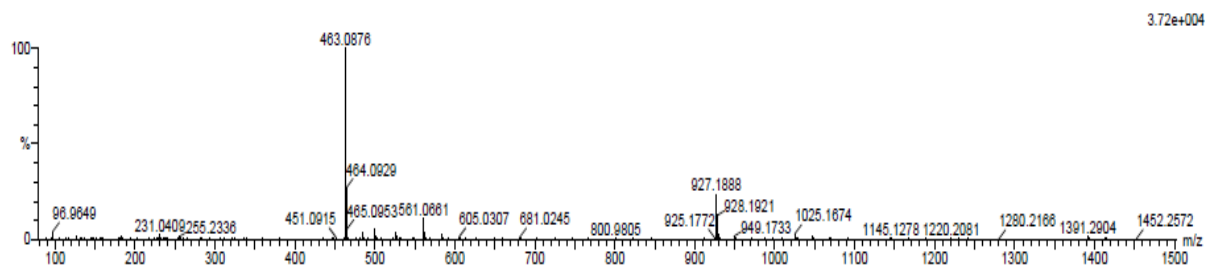


Figura 18 - Espectro de massa (ES-) do composto AC36-37-2

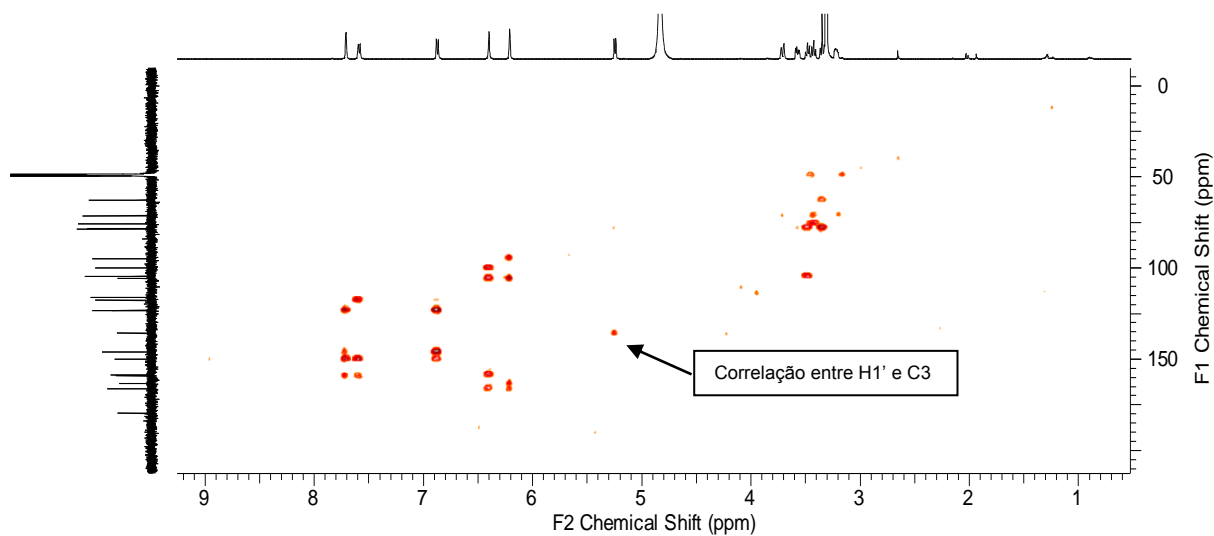


Figura 19 - Espectro HMBC do composto AC36-37-2

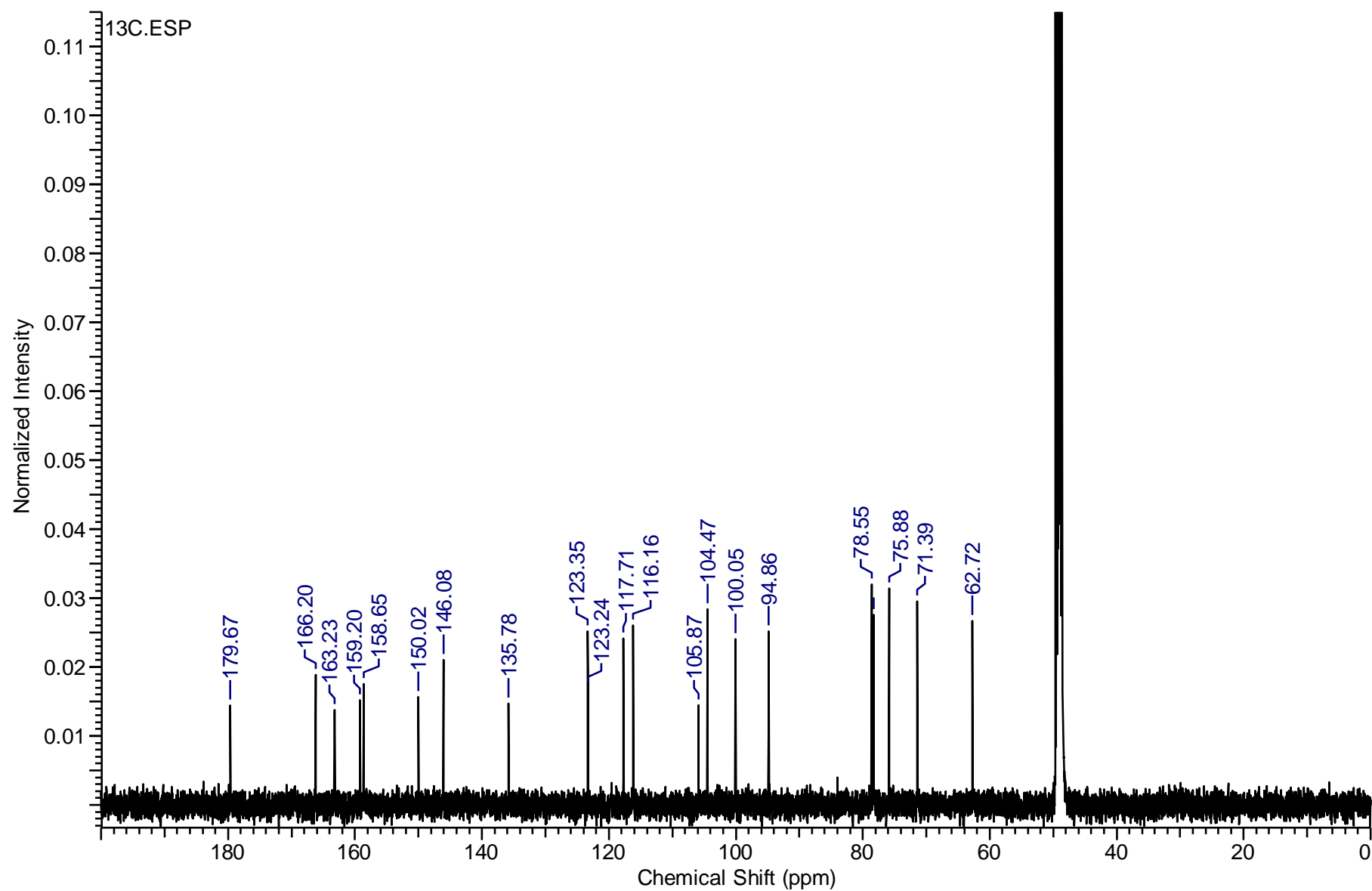


Figura 20 - Espectro RMN-¹³C do composto AC36-37-2 em CD₃OD a 125,76 MHz e 25 °C

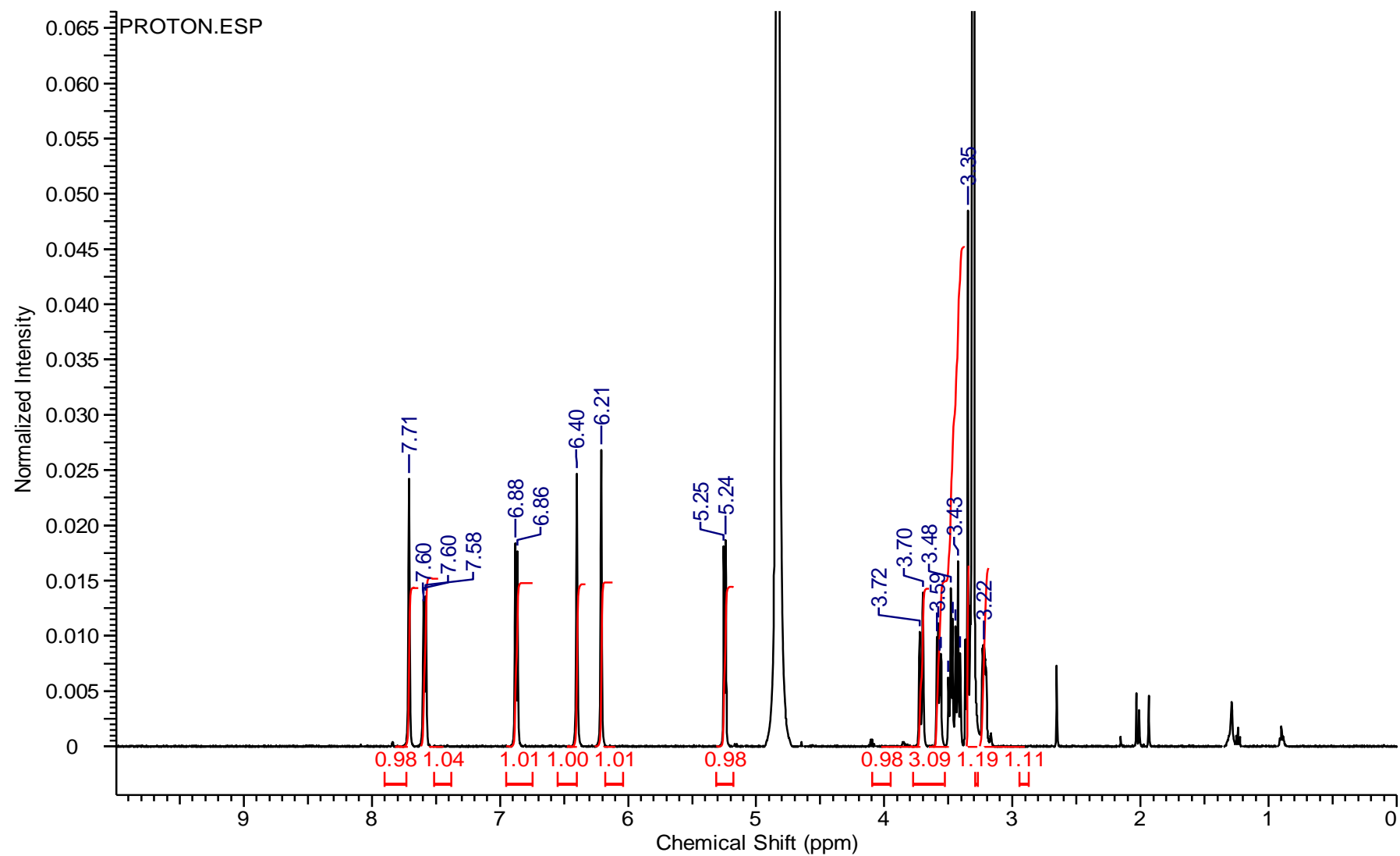


Figura 21 - Espectro RMN-¹H do composto AC36-37-2 em CD₃OD a 500 MHz e 25 °C

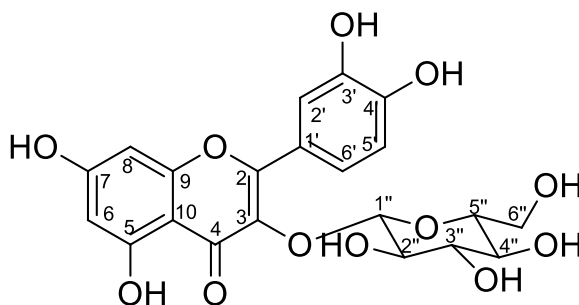


Figura 22 - Estrutura química da isoquercetrina

5.4.2.3 AC36-37-4

Este composto (2,7 mg) se apresentou muito similar ao composto AC36-37-2. Um pó amarelo amorfo cujos espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C foram obtidos em 500 MHz e 125,76 MHz, respectivamente, em CD_3OD . Os espectros de RMN revelaram ser outro flavonoide glicosilado derivado da quercetina, o qual se diferencia apenas pela unidade glicosídica. Encontram-se os 15 carbonos característicos da estrutura básica dos flavonoides e cinco carbonos referentes ao glicosídeo (figura 23). No espectro de RMN- ^1H observam-se os deslocamentos dos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos de flavonoides na região de 6-8 ppm, e os deslocamentos dos hidrogênios ligados à unidade glicosídica na região de 3-4 ppm (tabela 8) (figura 24).

Para identificação do glicosídeo verificou-se o hidrogênio anomérico em δ 5,17 com $J = 6,3$ Hz e os carbonos em δ 104,7 ($\text{C}1''$), δ 74,2 ($\text{C}3''$), δ 73,0 ($\text{C}2''$), δ 69,2 ($\text{C}4''$) e δ 67,0 ($\text{C}5''$) os quais, comparados com dados da literatura, indicam a presença de um grupo α -arabinopiranosil, cuja ligação ao carbono 3 foi evidenciada pela correlação entre o próton em δ 5,17 ($\text{H}1''$) e o carbono em δ 135,8 ($\text{C}3$) no experimento HMBC (figura 25) (PISTELLI *et al.*, 1993).

Tabela 8 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN-¹H e RMN-¹³C do composto AC36-37-4

Posição	¹ H	¹³ C	COSY	NOESY	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
2	-	158,6			
3	-	135,8			
4	-	179,6			
5	-	163,2			
6	6,21 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2)	100,4	H8		C5,C7,C8,C10
7	-	166,2			
8	6,41 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2)	94,8	H6		C6,C10
9	-	158,8			
10	-	105,8			
1'	-	123,0			
2'	7,74 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2)	117,6	H6'	H2'',H5''a	C2,C3',C4'C6'
3'	-	146,1			
4'	-	150,1			
5'	6,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2)	116,3	H6'	H6'	C3',C6',
6'	7,58 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2 e 2,2)	123,2	H2',H5'	H5',H5''a	C2,C2',C4'
Arabinopiranoose					
1''	5,17 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,3)	104,7	H2''	H2'',H3'', H5''b	C3
2''	3,90 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5 e 6,3)	73,0	H1'', H3''	H1'',H3''	C1'',C3''
3''	3,65 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5 e 3,1)	74,2	H2''	H1'',H2''	C5''
4''	3,81 (1H, <i>s</i>)	69,2			C1'',C3''
5''	3,82 (1Ha, <i>m</i>)	67,0	H5''b	H5''b	C1'',C3''
	3,44 (1Hb, <i>dd</i> , <i>J</i> = 13,5 e 3,1)		H5''a	H1'',H5''a	

As correlações carbono-hidrogênio foram estabelecidas pelo experimento HSQC e HMBC, e os acoplamentos entre os hidrogênios pelo COSY e NOESY.

O espectro de massas de alta resolução apresentou um *m/z* de 433,0769 [M - H]⁻ C₂₀H₁₇O₁₁⁻, sendo a massa calculada igual a 433,0771 (figura 26). Seu poder rotatório foi medido em [α]_D²⁰ = -15,0° (*c* 0,1 mg/100 mL, MeOH), na literatura encontrou-se [α]_D²⁰ = -53,96° (*c* 1, MeOH) (MECHIKOVA *et al.*, 2008). Por comparação com dados da literatura identificou-se este composto como o flavonoide quercetina-3-O-α-arabinopiranosideo, conhecido como guaijaverina (figura 27) (SAKAR *et al.*, 2005; PRABU, GNANAMANI e SADULLA, 2006). A guaijaverina foi isolada pela primeira vez nos extratos de *R. induta*. Este composto possui atividade antibacteriana já conhecida contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis* e *Streptococcus mutans* (PRABU, GNANAMANI e SADULLA, 2006), portanto pode contribuir para o potencial antibacteriano da espécie em estudo, além de disso possui atividade antioxidante, como descrito para os outros flavonoides.

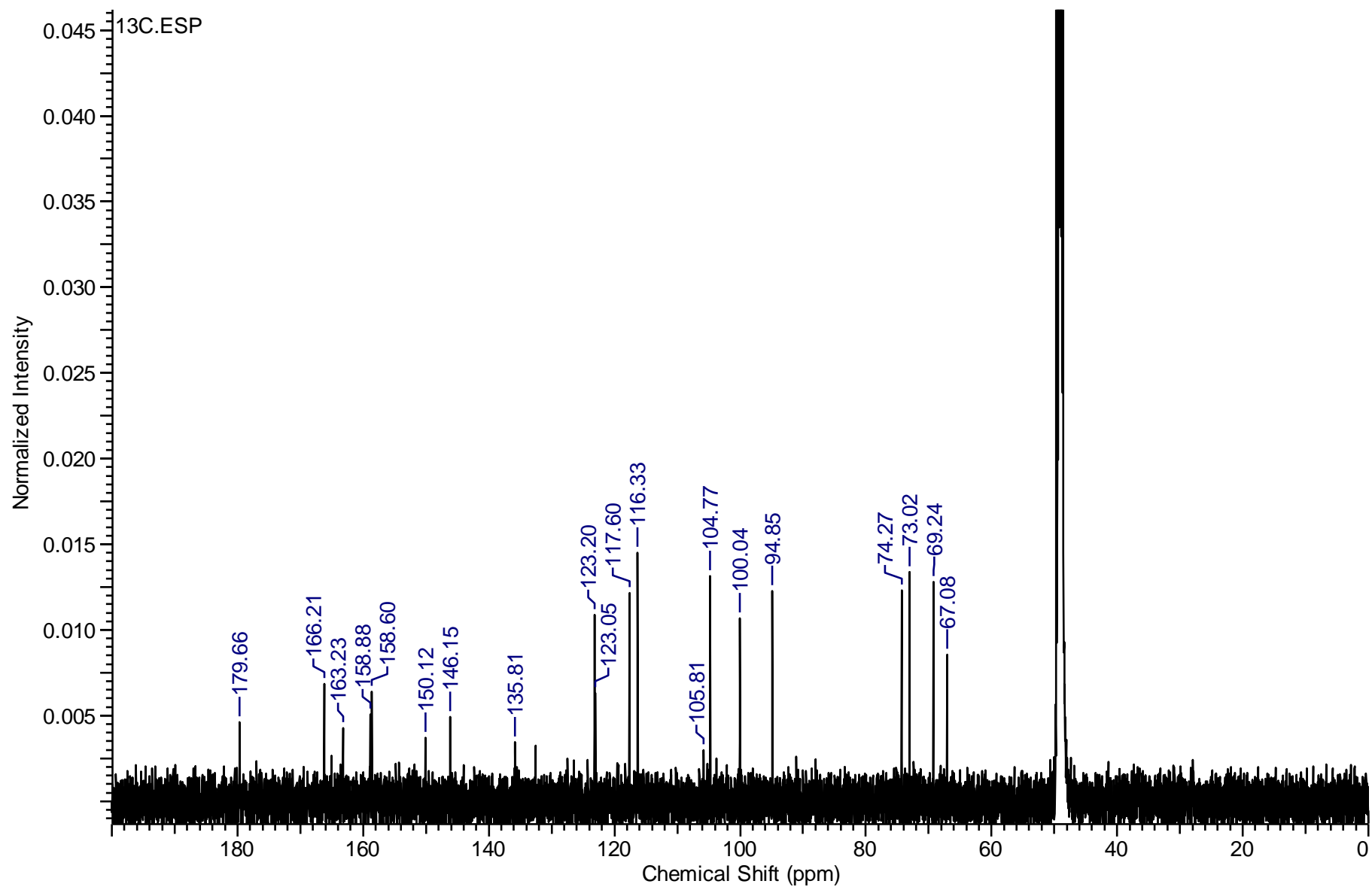


Figura 23 - Espectro RMN-¹³C do composto AC36-37-4 em CD₃OD a 125,76 MHz e 25 °C

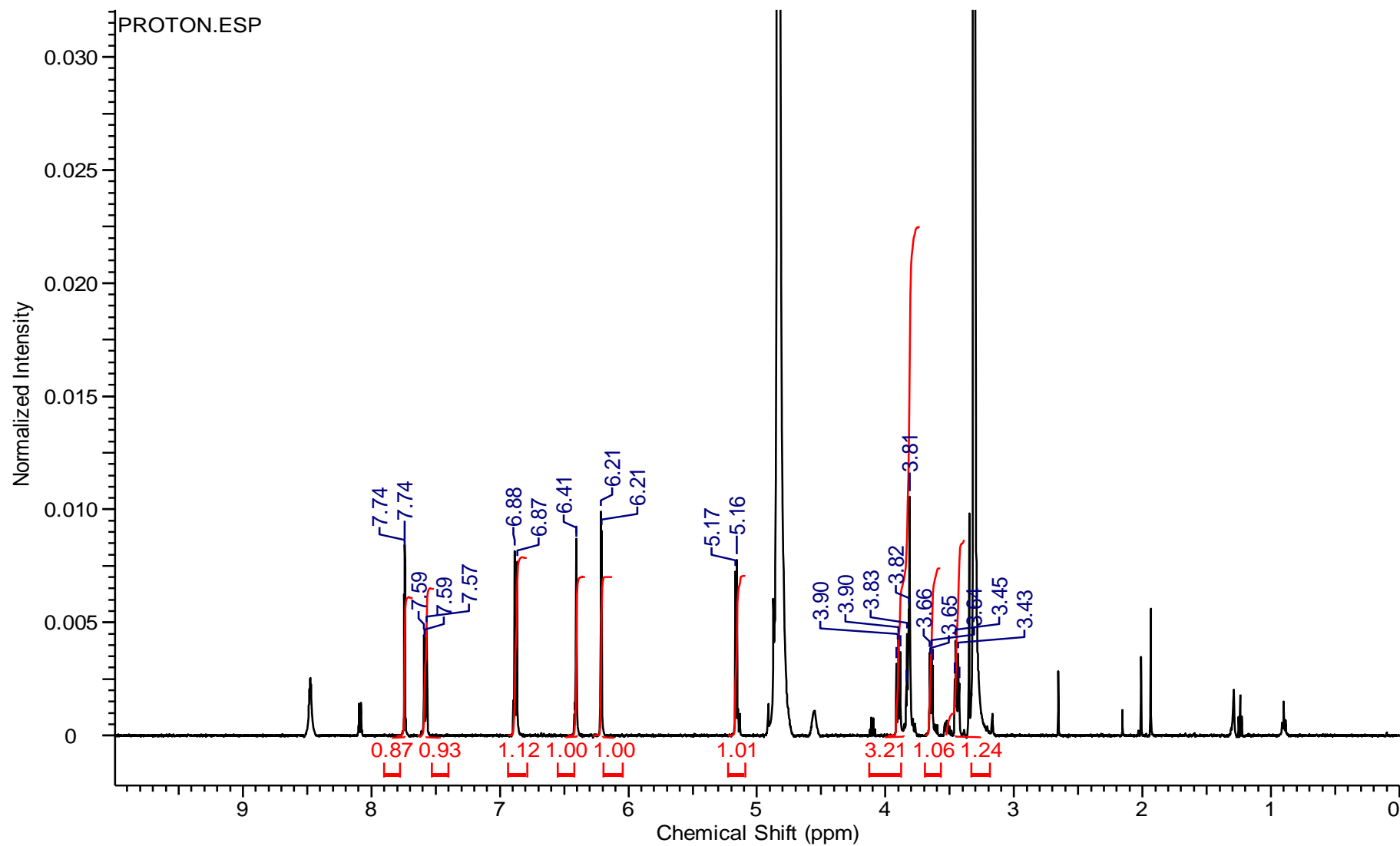


Figura 24 - Espectro RMN-¹H do composto AC36-37-4 em CD₃OD a 500 MHz e 25 °C

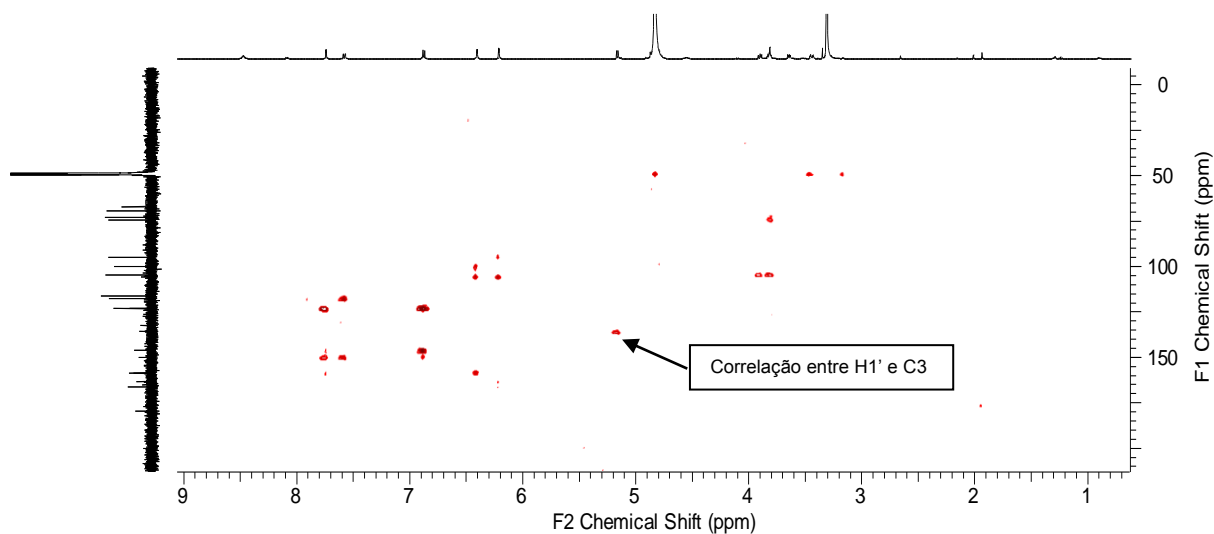


Figura 25 - Espectro HMBC composto AC36-37-4

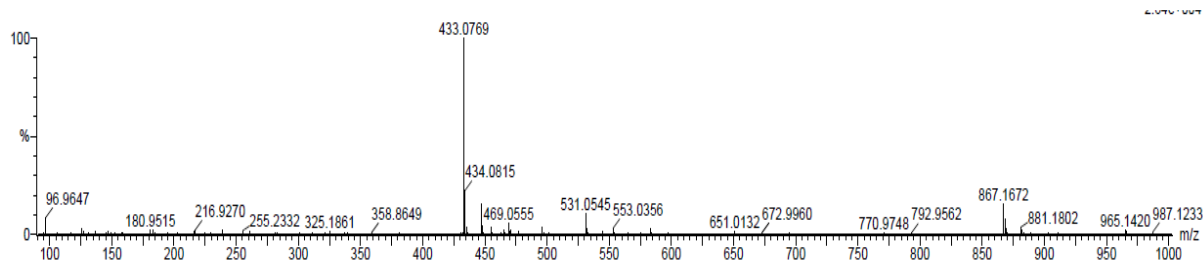


Figura 26 - Espectro de massa (ES-) do composto AC36-37-4

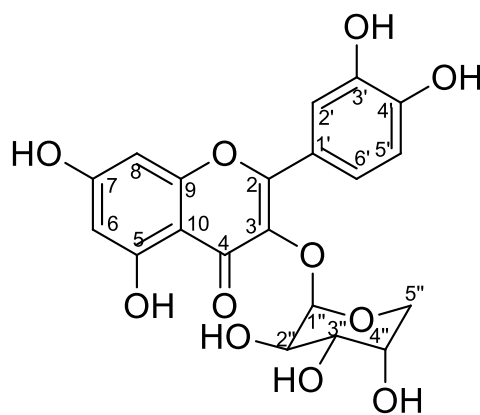


Figura 27 - Estrutura química da guaijaverina

5.4.3 Proantocianidinas

5.4.3.1 AC30-33-1

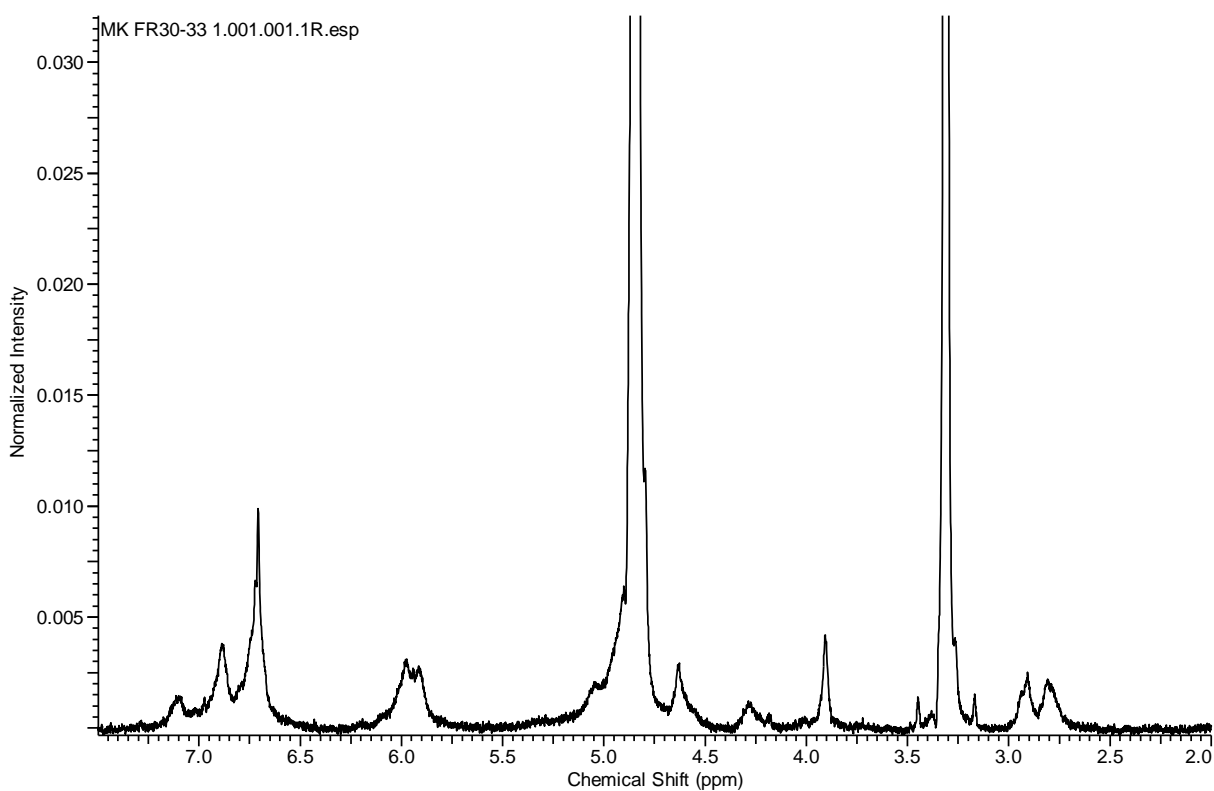
Este composto (2,2 mg) isolado da fração acetato de etila foi caracterizado como um pó amorfo de coloração acastanhada. Seu espectro RMN- ^1H em temperatura ambiente apresentou picos largos difíceis de identificar, o que, devido aos deslocamentos químicos observados e a aparência dos picos, indicou que possivelmente este composto seria um dímero da epicatequina ou da catequina (figura 28). Esse tipo de composto, as procianidinas, em temperatura ambiente (25 °C) apresentam sinais de prótons largos em espectro de RMN- ^1H devido à atropoisomerismo resultante da interação estérica entre os átomos vizinhos à ligação interflavonoide, onde as unidades de flavonoides possuem livre rotação, situação que é amenizada com baixa temperatura (SHOJI *et al.*, 2003). Portanto, para a identificação desta molécula o espectro RMN- ^1H foi realizado em CD_3OD à 600 MHz com uma temperatura de -30 °C, no qual os picos se mostraram mais afinados permitindo sua análise (figura 29).

A presença dos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos entre δ 6,0 e δ 7,0, os quais possuem integração para dois hidrogênios, indicaram a presença de mais de uma unidade flavonoídica, e os hidrogênios em δ 2,81 e δ 2,95 mostraram a presença de um CH_2 , que está na posição quatro da unidade A do dímero, sendo esta unidade identificada como a epicatequina (tabela 9) (SHOJI *et al.*, 2003).

O espectro de massas de alta resolução revelou um m/z de 577,1356 $[\text{M-H}]^-$ correspondente a uma fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{O}_{12}^-$, confirmando se tratar de um dímero da epicatequina (figura 30).

Tabela 9 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H do composto AC30-33-1

Posição	Experimental	SHOJI <i>et al.</i> (2003)
Unidade A	^1H	^1H
2	4,97 (s, 1H)	4,95 (s)
3	4,26 (m, 1H)	4,24 (t)
4	2,81 (d, 1H, $J = 18,3$) 2,95 (dd, $J = 16,9$ e 4,0)	2,79 (d, $J = 17,0$) 2,94 (dd, $J = 17,0$ e 4,0)
6	5,89 (s, 1H)	5,88 (s)
2'	7,11 (d, 1H, $J = 8,4$)	7,10 (d, $J = 2,0$)
5'	6,73 (d, 1H, $J = 8,4$)	6,72 (d, $J = 8,0$)
6'	6,86 (dd, 1H, $J = 8,4$ e 1,8)	6,85 (dd, $J = 8,0$ e 2,0)
Unidade B		
2	5,07 (s, 1H)	5,06 (s)
3	3,80 (s, 1H)	3,79 (s)
4	4,63 (s, 1H)	4,61 (s)
6	5,93 (d, 1H, $J = 2,6$)	5,92 (d, $J = 2,0$)
8	5,95 (d, 1H, $J = 2,2$)	5,94 (d, $J = 2,0$)
2'	6,85 (d, 1H, $J = 1,8$)	6,83 (d, $J = 2,0$)
5'	6,69 (d, 1H, $J = 8,4$)	6,68 (d, $J = 8,0$)
6'	6,61 (m, 1H)	6,60 (dd, $J = 8,0$ e 2,0)

Figura 28 - Espectro RMN- ^1H de AC30-33-1 em CD_3OD a temperatura ambiente (25 °C) a 500 MHz

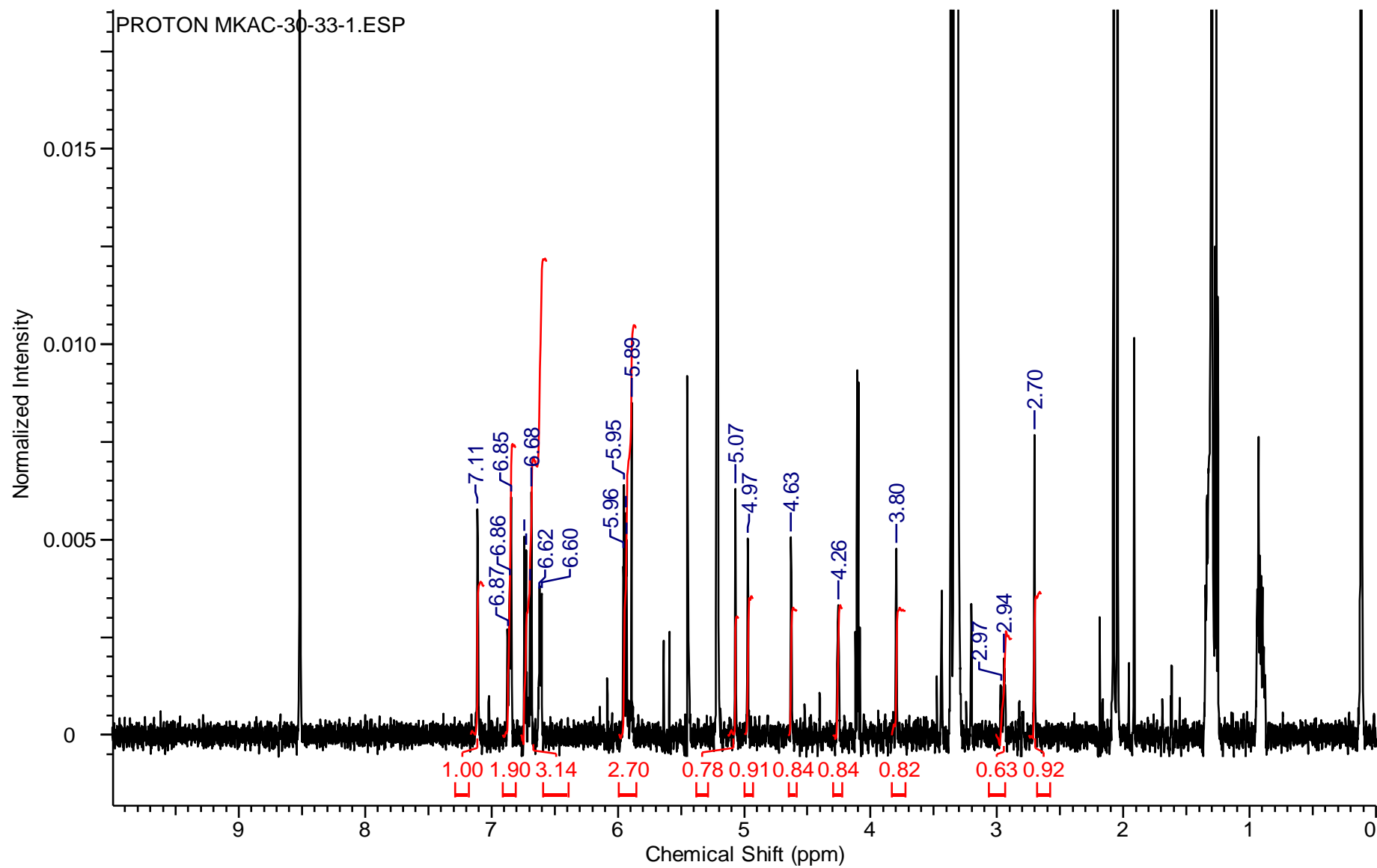


Figura 29 - Espectro RMN-¹H de AC30-33-1 em CD₃OD a -30 °C a 600 MHz

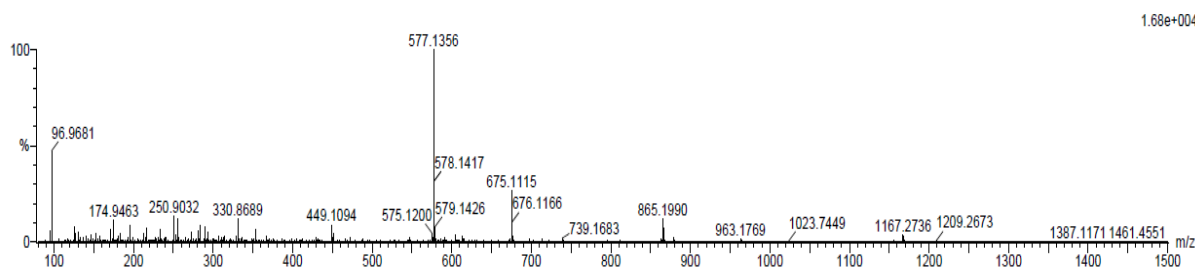


Figura 30 - Espectro de massa (ES-) de AC30-33-1

Por comparação com dados da literatura o composto AC30-33-1 foi identificado como a procianidina B2, a epicatequina-(4 β -8)-epicatequina (figura 31), cuja ligação entre as unidades A e B está entre os carbonos 4 β e 8, uma vez que não se encontram prótons na posição 8 da unidade A e apenas um na posição 4 da unidade B (SHOJI *et al.*, 2003). Seu poder rotatório foi medido em $[\alpha]_D^{20} = +26,0^\circ$ (c 0,1 mg/100 mL, MeOH), semelhante ao encontrado na literatura $[\alpha]_D^{20} = +29,2^\circ$ (c 0,15, MeOH) (FOO e KARCHESY, 1989).

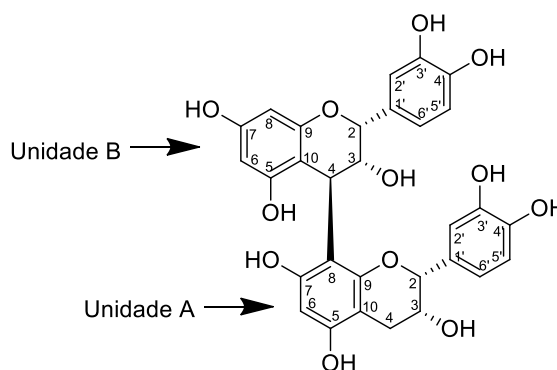


Figura 31 - Estrutura química da procianidina B2

5.4.3.2 EAS12-3

Este composto (2,3 mg) apresentou características muito semelhantes ao composto AC30-33-1. Coloração acastanhada, picos do espectro de RMN- ^1H largos quando feito à temperatura ambiente (figura 32) indicaram também se tratar de um oligômero da catequina ou epicatequina, portanto, para uma melhor resolução, seu espectro RMN- ^1H também foi feito em CD_3OD em 600 MHz e a -30°C (figura 34).

Os hidrogênios entre δ 6,0-7,0 mostram a presença de anéis aromáticos de flavonoides, e observando-se as integrações dos hidrogênios na região de δ 6,70, correspondentes aos hidrogênios H5' e H6' do anel B flavonoídico, que integram para 6 hidrogênios; e os hidrogênios em δ 5,90, hidrogênios H6 e H8 da anel A, integrando para 4 hidrogênios, percebe-se a presença de três unidades de flavonoides. Os hidrogênios em δ 2,81 e δ 2,97 correspondem a um CH₂ do carbono C4, caracterizando a unidade A do trímero como a epicatequina, a qual não apresentou nenhum hidrogênio na posição 8, indicando uma possível ligação entre as unidades neste local. Para as unidades B e C verificou-se apenas um hidrogênio na posição 4, e na unidade B nenhum hidrogênio também na posição 8, o que indica, por comparação com dados da literatura, que as unidades de flavonoides são ligadas entre si pelas as posições 4 e 8 (tabela 10) (SHOJI *et al.*, 2003).

O espectro de massas de alta resolução para esta molécula apresentou um m/z de 865,2000 [M-H]⁻, (figura 33) correspondente a uma fórmula molecular de C₄₅H₃₇O₁₈⁻, confirmando se tratar de um trímero, e seu poder rotatório foi medido em $[\alpha]_D^{20} = +64,0^\circ$ (c 0,1 mg/100 mL), o qual corresponde ao descrito na literatura $[\alpha]_D^{27} = +59,3^\circ$ (c 0,30, MeOH) (SAITO *et al.*, 2004).

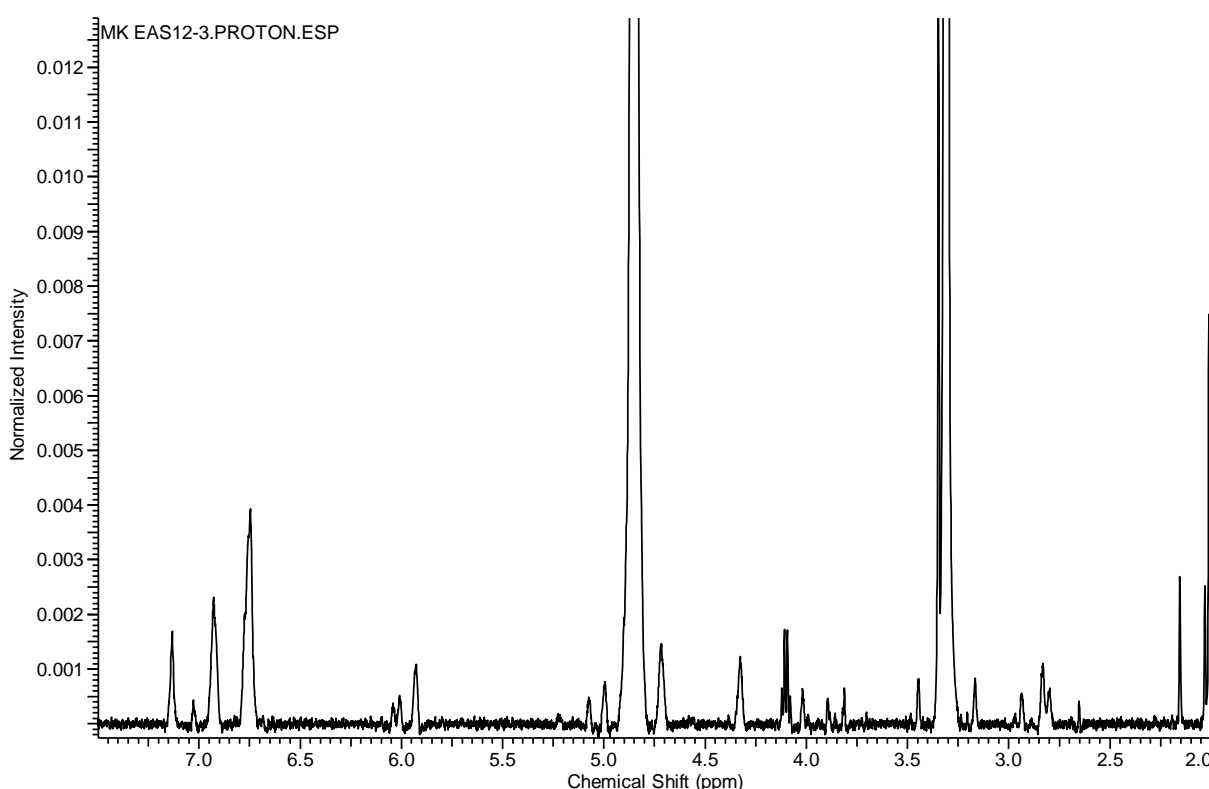


Figura 32 - Espectro RMN-¹H de EAS12-3 em CD₃OD a temperatura ambiente (25 °C) a 500 MHz

Tabela 10 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN-¹H do composto EAS12-3

Posição	Experimental	SHOJI <i>et al.</i> (2003)
Unidade A	¹ H	¹ H
2	5,00 (s, 1H)	4,98 (s)
3	4,31 (m, 1H)	4,31 (t)
4	2,81 (d, 1H, <i>J</i> = 17,2) 2,97 (m, 1H)	2,81 (d, <i>J</i> = 16,0) 2,94 (dd, <i>J</i> = 16,0 e 4,0)
6	5,94 (s, 1H)	5,92 (s)
2'	7,11 (d, 1H, <i>J</i> = 1,5)	7,11 (d, <i>J</i> = 2,0)
5'	6,74 (t, 1H, <i>J</i> = 8,0)	6,74 (d, <i>J</i> = 8,0)
6'	6,88 (m, 1H)	6,88
Unidade B		
2	5,26	5,23 (s)
3	3,90 (m, 1H)	3,94 (s)
4	4,68 (s, 1H)	4,68 (s)
6	5,89 (s, 1H)	5,88 (s)
2'	7,02 (s, 1H)	7,02 (s)
5'	6,70 (m, 1H)	6,71
6'	6,68 (m, 1H)	6,67
Unidade C		
2	5,09 (s, 1H)	5,06 (s)
3	3,96 (s, 1H)	3,97 (s)
4	4,68 (s, 1H)	4,68 (s)
6	5,94 (d, 1H, <i>J</i> = 1,8)	5,97 (d, <i>J</i> = 2,0)
8	5,98 (d, 1H, <i>J</i> = 2,2)	6,00 (d, <i>J</i> = 2,0)
2'	6,90 (d, 1H, <i>J</i> = 1,8)	6,89 (d, <i>J</i> = 2,0)
5'	6,73 (m, 1H)	6,72
6'	6,69 (m, 1H)	6,69

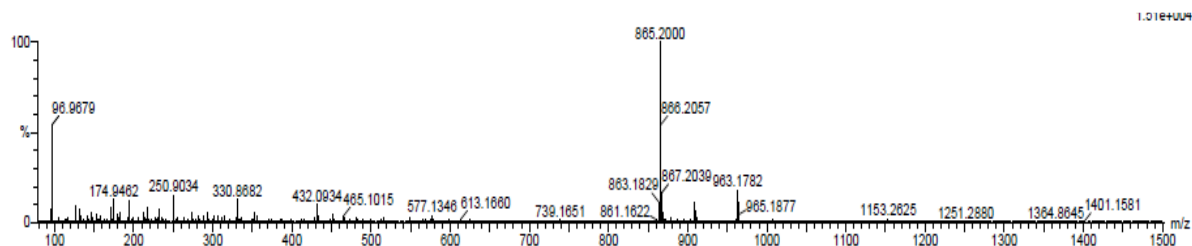


Figura 33 - Espectro de massa (ES-) de EAS12-3

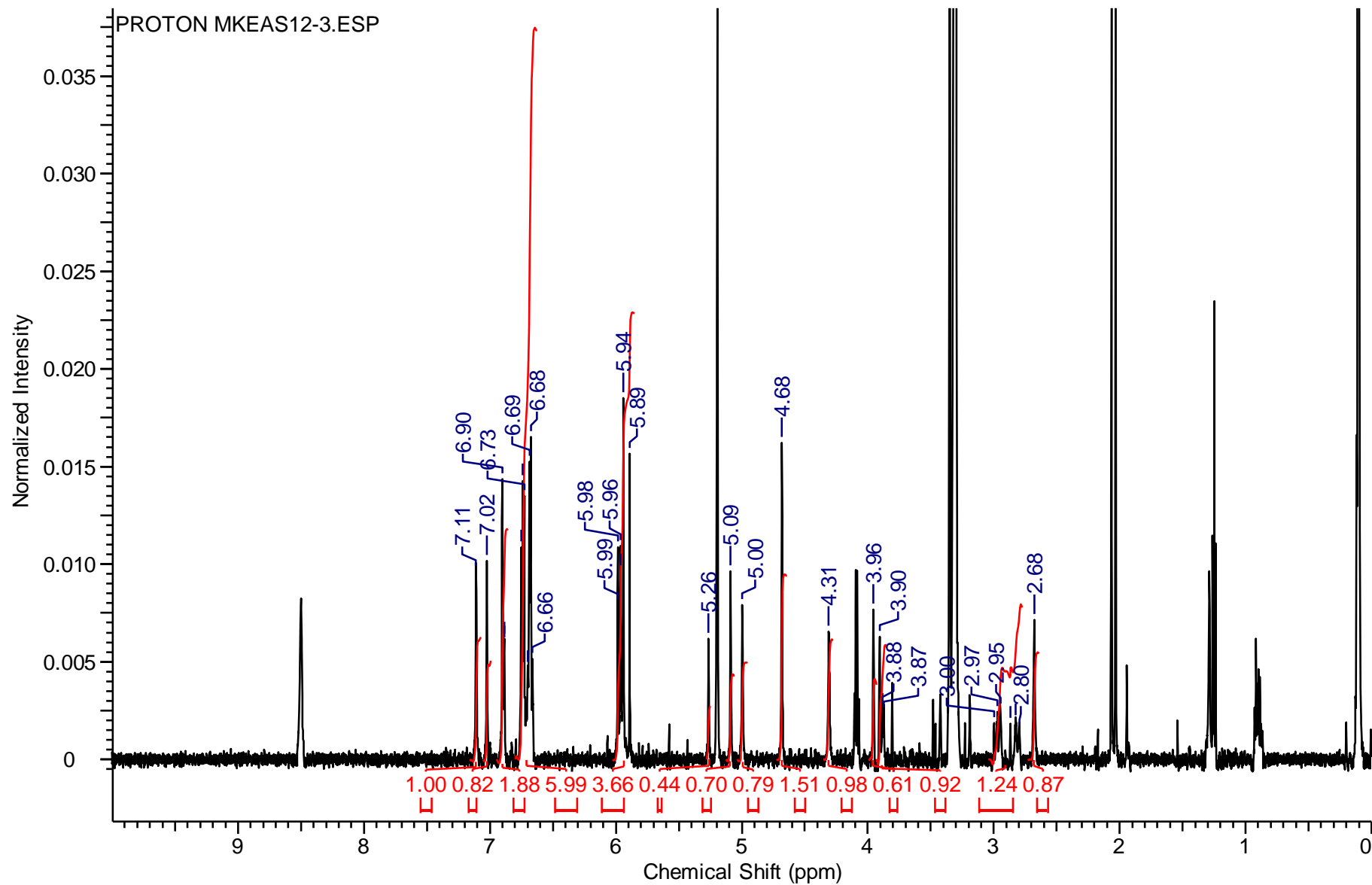


Figura 34 - Espectro RMN- ^1H de EAS12-3 em CD_3OD a $-30\text{ }^\circ\text{C}$ a 600 MHz

Comparando os dados experimentais com aqueles descritos na literatura, esta molécula foi identificada como a procianidina C1, um trímero da epicatequina (epicatequina-4 β -8-epicatequina-4 β -8-epicatequina) (figura 35) (SHOJI *et al.*, 2003). Ambas procianidinas ainda não haviam sido descritas na espécie em estudo, estes compostos apresentam certas funcionalidades fisiológicas como antialérgicos, anticáries, anti-hipertensivo, antioxidante e crescimento de cabelo (SHOJI *et al.*, 2003).

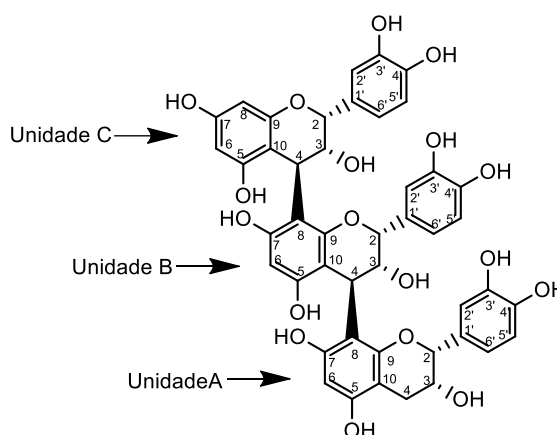


Figura 35 - Estrutura química da procianidina C1

5.4.4 Derivados do Ácido Clorogênico

5.4.4.1 EAS7-2

Esta molécula foi classificada como um pó amorfo de coloração marrom (1,5 mg). Os espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C foram realizados em solvente CD₃OD em 500 e 125,76 MHz, respectivamente (tabela 11).

Os hidrogênios em δ 7,56 (H7') e δ 6,28 (H8') com constantes de acoplamento de 15,5 Hz indicam a presença de uma dupla ligação com configuração *trans* derivada do grupo cafeoil (derivado do ácido cafêico), e os hidrogênios em δ 7,04 (H2'); δ 6,78 (H5') e δ 6,95 (H6') confirmam a presença do anel aromático do grupo cafeoil com acoplamento orto (J = 7,9 Hz) entre H5' e H6', sendo este anel trissubstituído em C1', C3' e C4' (figura 36 e 38). A interação H-C pelo experimento HMBC permitiu verificar a presença de duas carboxilas (172,5 e 168,0 ppm) (figura 39). A presença de dois carbonos metilênicos, ambos em δ 39,0 (C2 e C6), três

carbonos metínicos, os quais possuem um oxigênio acoplado, em δ 72,1 (C3 e C5) e δ 74,3 (C4), e um carbono quaternário em δ 72,1 (C1), juntamente com a carboxila em δ 172,5 indicam a presença do ácido quínico. Os hidrogênios desta unidade foram identificados no multipeto em δ 5,36 (H3), dubleto em δ 3,72 (H4) e multipeto δ 4,16 (H5) correspondente a grupos metino, posições estas definidas pelo experimento COSY (figura 37) (LIN, YANG e CHOU, 2002).

Tabela 11 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- ^1H do composto EAS7-2

Posição	^1H	^{13}C	COSY ^a	NOESY ^a	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) ^a
1	-	72,1			
2	2,15 (<i>m</i> , 1H ax) 2,01 (<i>m</i> , 1H eq)	39,0	H3 H3	H3, H4 H3	C7
3	5,36 (<i>m</i> , 1H, J=9,3)	72,1	H4	H2ax, H2eq, H4	
4	3,72 (<i>dd</i> , 1H, J=9,3 e 2,4)	74,3	H3, H5	H2ax, H3, H5, H6ax	
5	4,16 (<i>m</i> , 1H)	72,1	H4	H2ax, H2eq, H3, H5, H6eq	
6	2,18 (<i>m</i> , 1H eq) 2,03 (<i>m</i> , 1H ax)	39,0	H5	H5 H4	
7	-	172,5			
1'	-	127,7			
2'	7,04 (<i>s</i> , 1H)	114,8	H6'	H8'	C3', C4', C6'
3'	-	146,7			
4'	-	149,2			
5'	6,78 (<i>d</i> , 1H, J = 7,9)	116,4	H6'		C1', C3'
6'	6,95 (<i>d</i> , 1H, J = 7,9)	122,6	H5'	H8'	C1', C7'
7'	7,56 (<i>d</i> , 1H, J = 15,5)	146,7	H8'	H6', H8'	C6', C8', C9'
8'	6,28 (<i>d</i> , 1H, J = 15,5)	114,8	H7'	H2', H6', H7'	C1', C9'
9'	-	168,0			

(^a) Correlações fracas são anotadas em *itálico*

A massa de alta resolução deste composto apresentou um m/z de 353,0874 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (calculada 353,0873), correspondendo à fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9^-$, o que confirma ser um ácido cafeoilquínico, podendo ser o ácido 5-O- ou o 3-O-cafeoilquínico (figura 40). Para confirmar a posição da ligação entre as unidades cafeoil e ácido quínico, foram utilizados padrões comerciais dos dois ácidos, os quais foram submetidos à CLAE analítica, isoladamente e co-injetados com o composto EAS7-2, desta maneira confirmou-se que este composto corresponde ao ácido-3-O-cafeoilquínico (figura 41), mais conhecido como ácido clorogênico (figura 42) (LIN, YANG e CHOU, 2002; CHOI *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2009;). Seu poder rotatório foi medido em $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13^\circ$ (c 0,1 mg/100mL, MeOH).

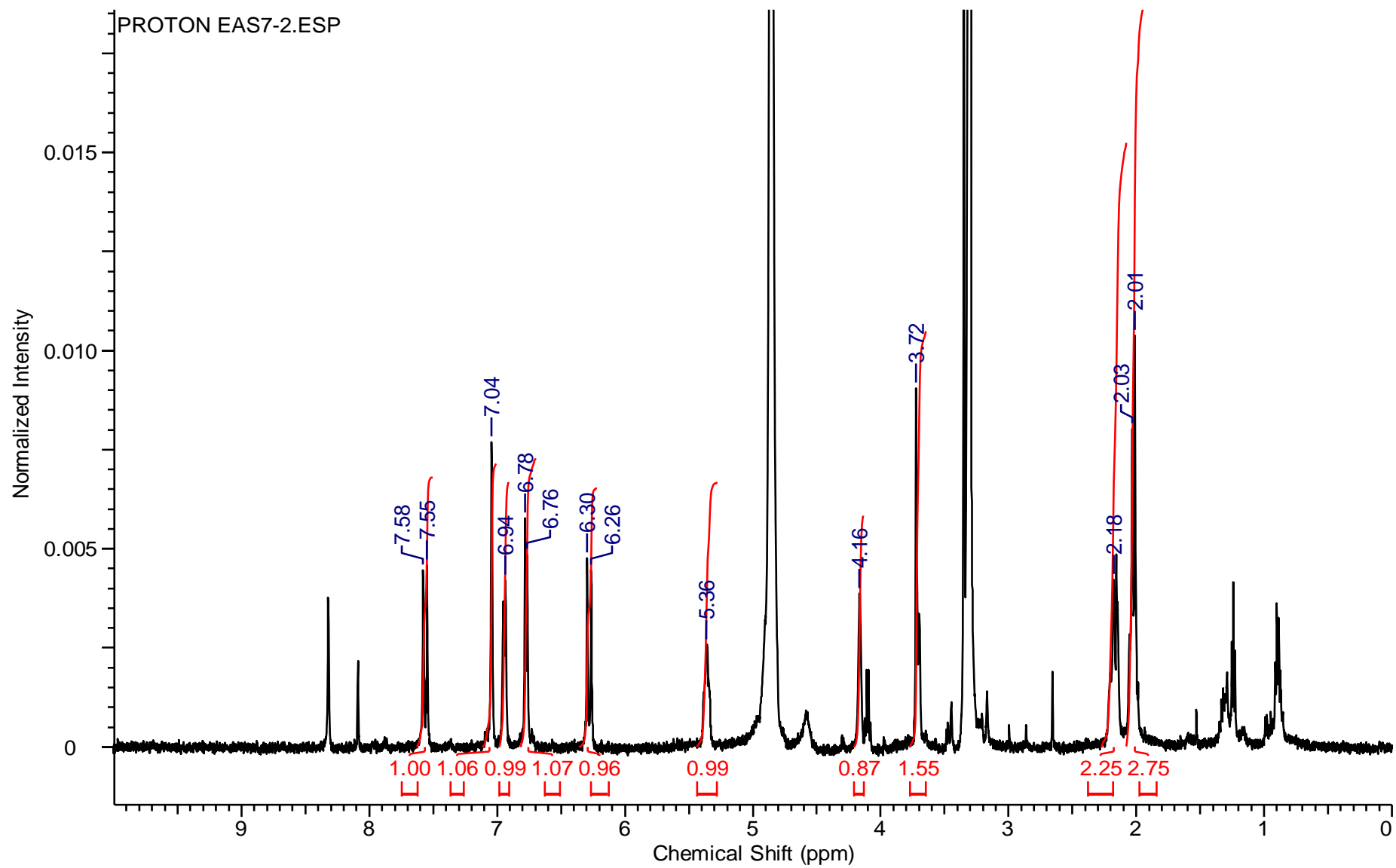


Figura 36 - Espectro RMN- ^1H de EAS7-2 em CD_3OD a 500 MHz e 25 °C

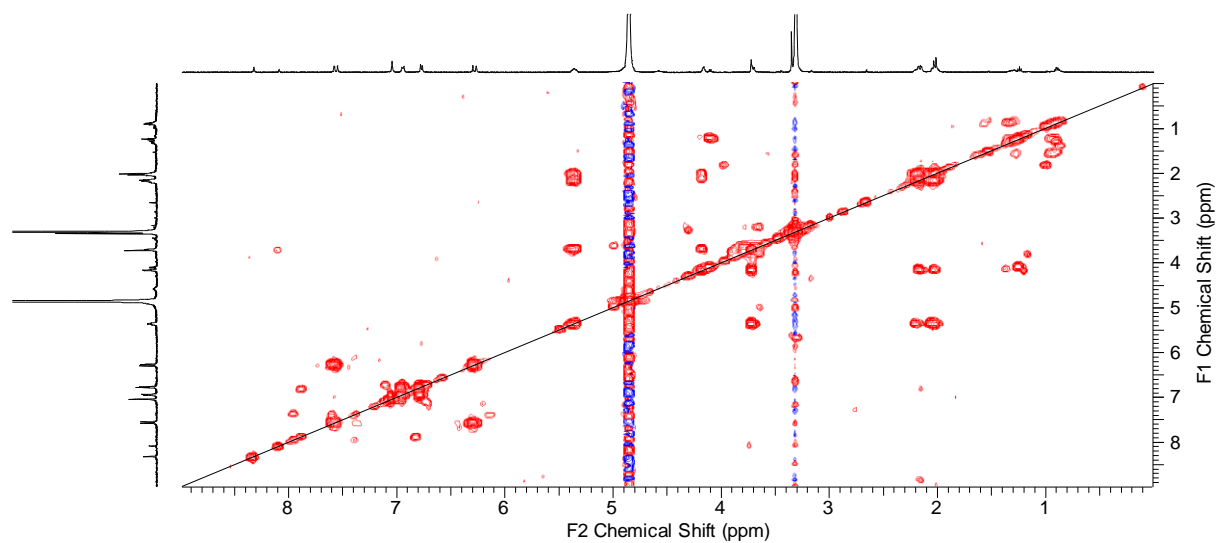


Figura 37 - Espectro COSY de EAS7-2

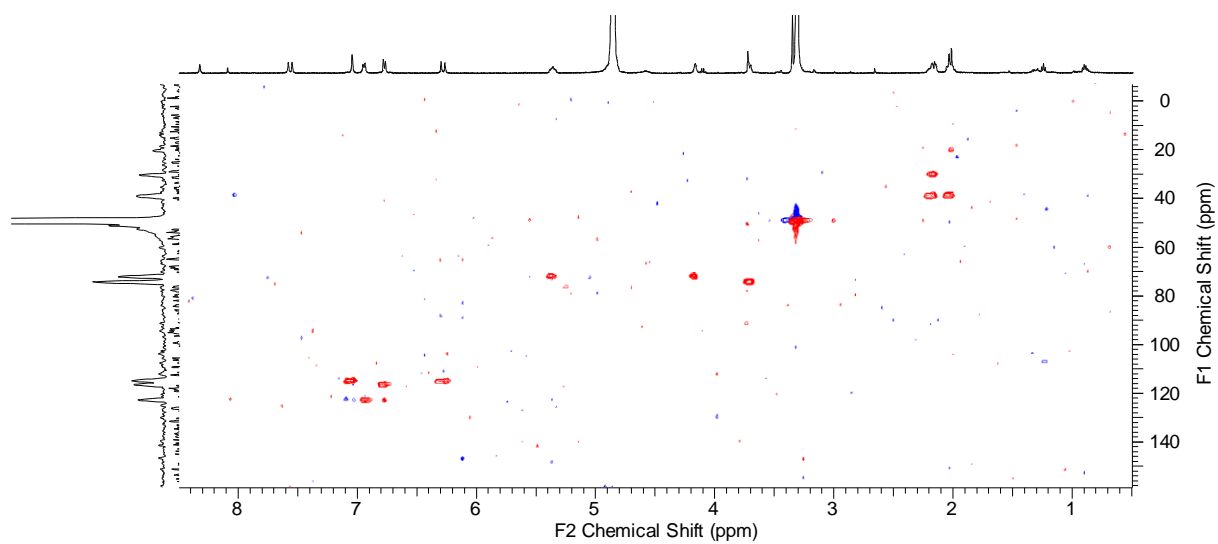


Figura 38 – Espectro HSQC de EAS7-2

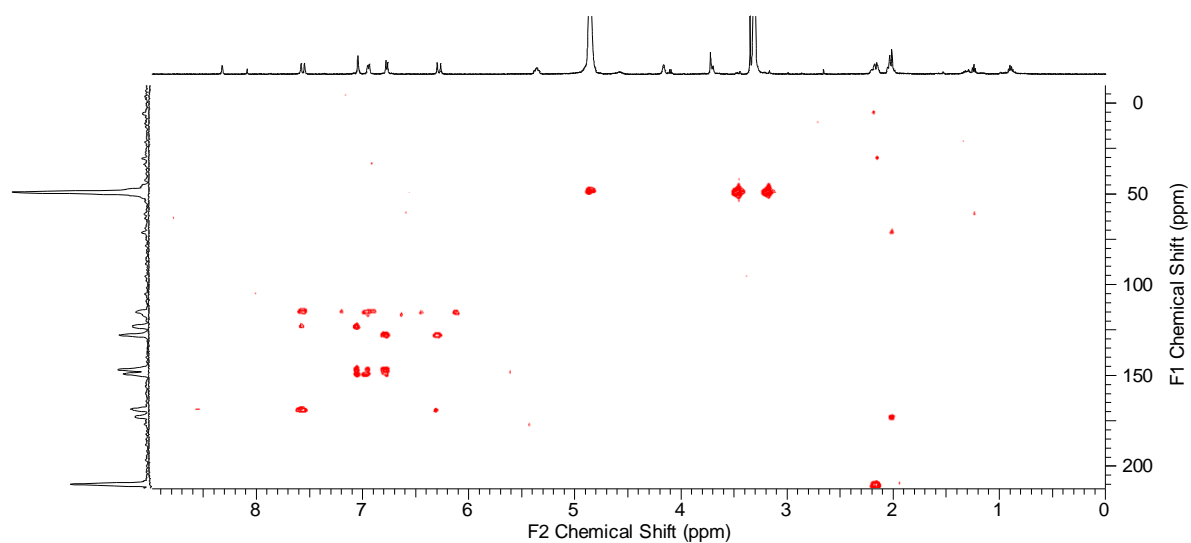


Figura 39 - Espectro HMBC de EAS7-2

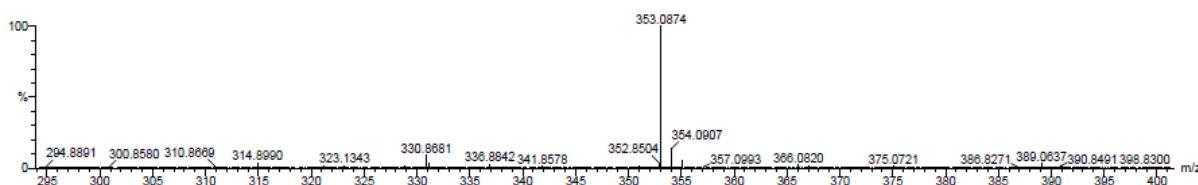


Figura 40 - Espectro de massa (ES-) de EAS7-2

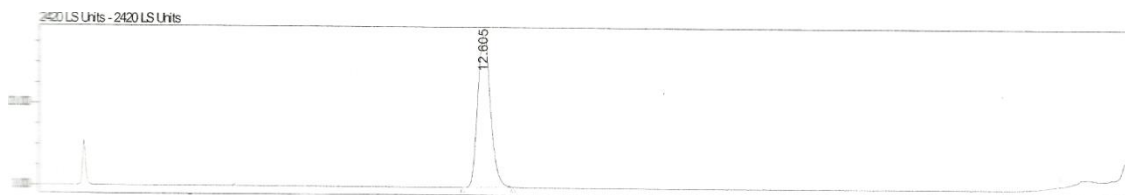


Figura 41 – Cromatograma de co-injeção do ácido clorogênico comercial e EAS7-2

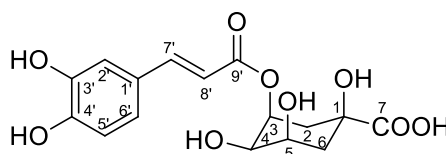


Figura 42 - Estrutura química do ácido clorogênico

5.4.4.2 EAS7-1

A identificação deste composto (1,2 mg) foi possível devido à semelhança de seus espectros ao ácido clorogênico identificado anteriormente. O RMN- ^1H foi feito em CD_3OD em 500 MHz (tabela 12) (figura 47). Foram identificados os hidrogênios em δ 7,58 ($\text{H}_{7'}$) e δ 6,31 ($\text{H}_{8'}$) com constantes de acoplamento de 15,7 Hz confirmando a presença da dupla ligação de configuração *trans* derivada do grupo cafeoil, e os hidrogênios em δ 7,05 ($\text{H}_{2'}$); δ 6,78 ($\text{H}_{5'}$) e δ 6,95 ($\text{H}_{6'}$) confirmaram a presença do anel aromático do grupo cafeoil com acoplamento orto entre $\text{H}_{5'}$ e $\text{H}_{6'}$ (figuras 44 e 47). Pelo HSQC foi possível identificar alguns dos carbonos ligados a hidrogênios, onde se encontrou os carbonos metilênicos em δ 39,7 (C2) e δ 37,5 (C6), e dois carbonos metínico ligados a oxigênio em δ 70,0 (C3) e δ 73,3 (C4) confirmando a presença do ácido quínico, cujos hidrogênios estão em δ 3,98 (H_3), δ

3,81 (H4) e δ 5,42 (H5) (figura 45). Sua massa de alta resolução apresentou um m/z de 353,0891 $[M - H]^-$ (calculada 353,0873), correspondendo à fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9^-$, o que confirma ser um ácido cafeoilquínico (figura 46).

A determinação da posição da ligação entre as duas unidades foi feita da mesma maneira do que para o ácido clorogênico, através da co-injeção com os padrões comerciais (figura 43), onde se confirmou ser o ácido-5-O-cafeoilquínico, conhecido como ácido neoclorogênico (figura 48) (CHAN *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2006; LIN, YANG e CHOU, 2002). Seu poder rotatório foi medido em $[\alpha]_D^{20} = -20,0^\circ$ (c 0,1 mg/100mL, MeOH), para o qual está descrito $[\alpha]_D^{20} = -23,5^\circ$ (c 0,7 MeOH) na literatura (XIANG *et al.*, 2001).

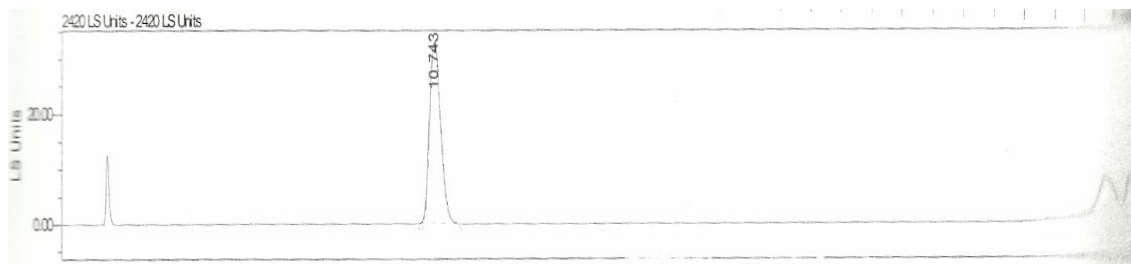


Figura 43 - Cromatograma de co-injeção do ácido neoclorogênico e EAS7-1

Tabela 12 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN- 1H do composto EAS7-1

Posição	1H	^{13}C	COSY
1	-	*	
2	2,07 (m, 1H) 1,94 (m, 1H)	39,7	H3 H3
3	3,98 (d, 1H, $J = 4,4$)	70,0	H2a, H2b H4
4	3,81 (m, 1H)	73,3	H3, H5
5	5,42 (m, 1H)	*	H4, H6a, H6b
6	2,07 (m, 2H)	37,5	
7	-	*	
1'	-	*	
2'	7,05 (d, 1H, $J = 1,6$)	115,1	H6'
3'	-	*	
4'	-	*	
5'	6,78 (d, 1H, $J = 8,2$)	116,3	H6'
6'	6,95 (d, 1H, $J = 8,2$)	122,7	H2', H5'
7'	7,58 (d, 1H, $J = 15,7$)	147,2	H8'
8'	6,31 (d, 1H, $J = 15,7$)	115,4	H7'
9'	-	*	

(*) - não foi possível identificar

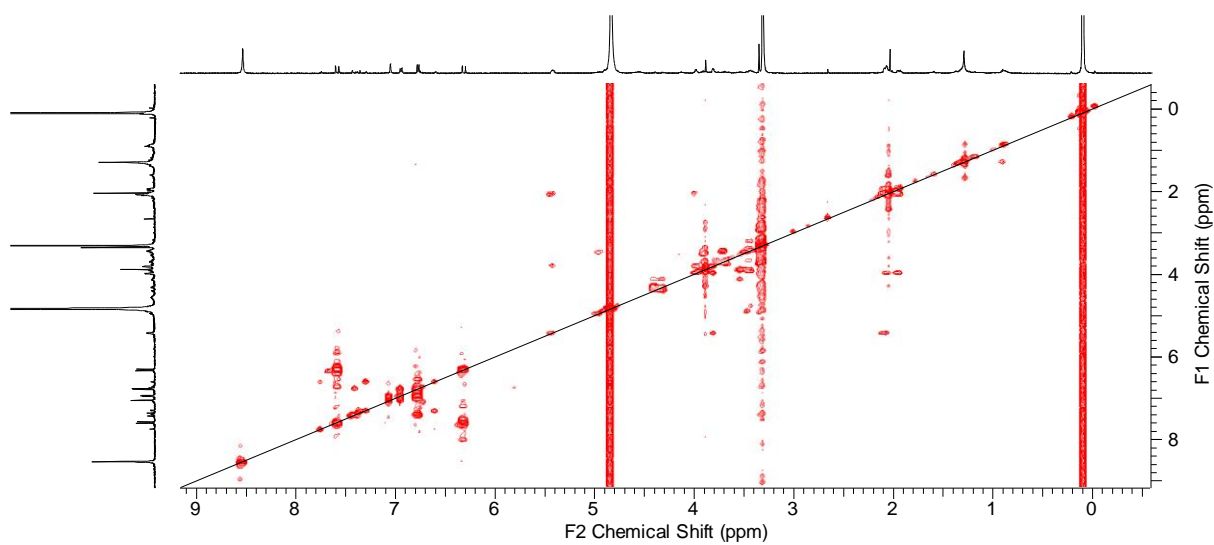


Figura 44 - Espectro COSY de EAS7-1

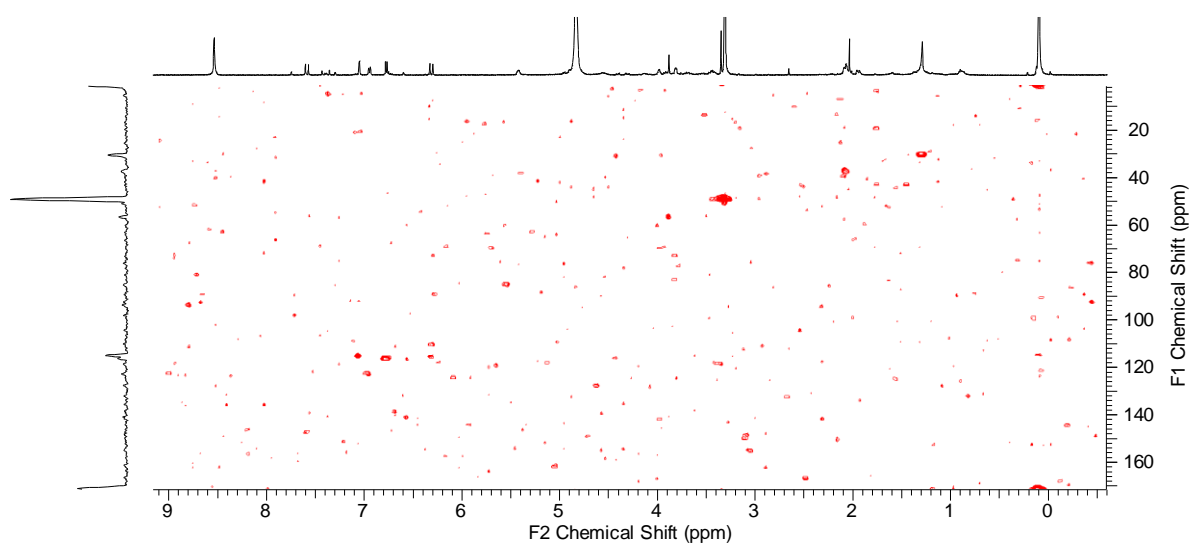


Figura 45 - Espectro HSQC de EAS7-1

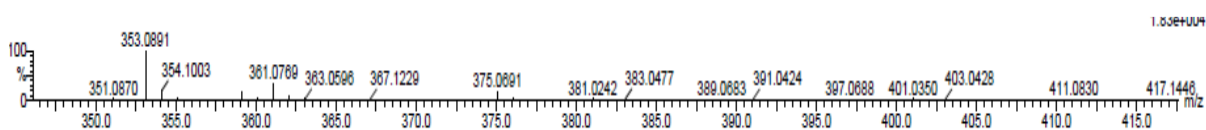


Figura 46 - Espectro de massa (ES-) de EAS7-1

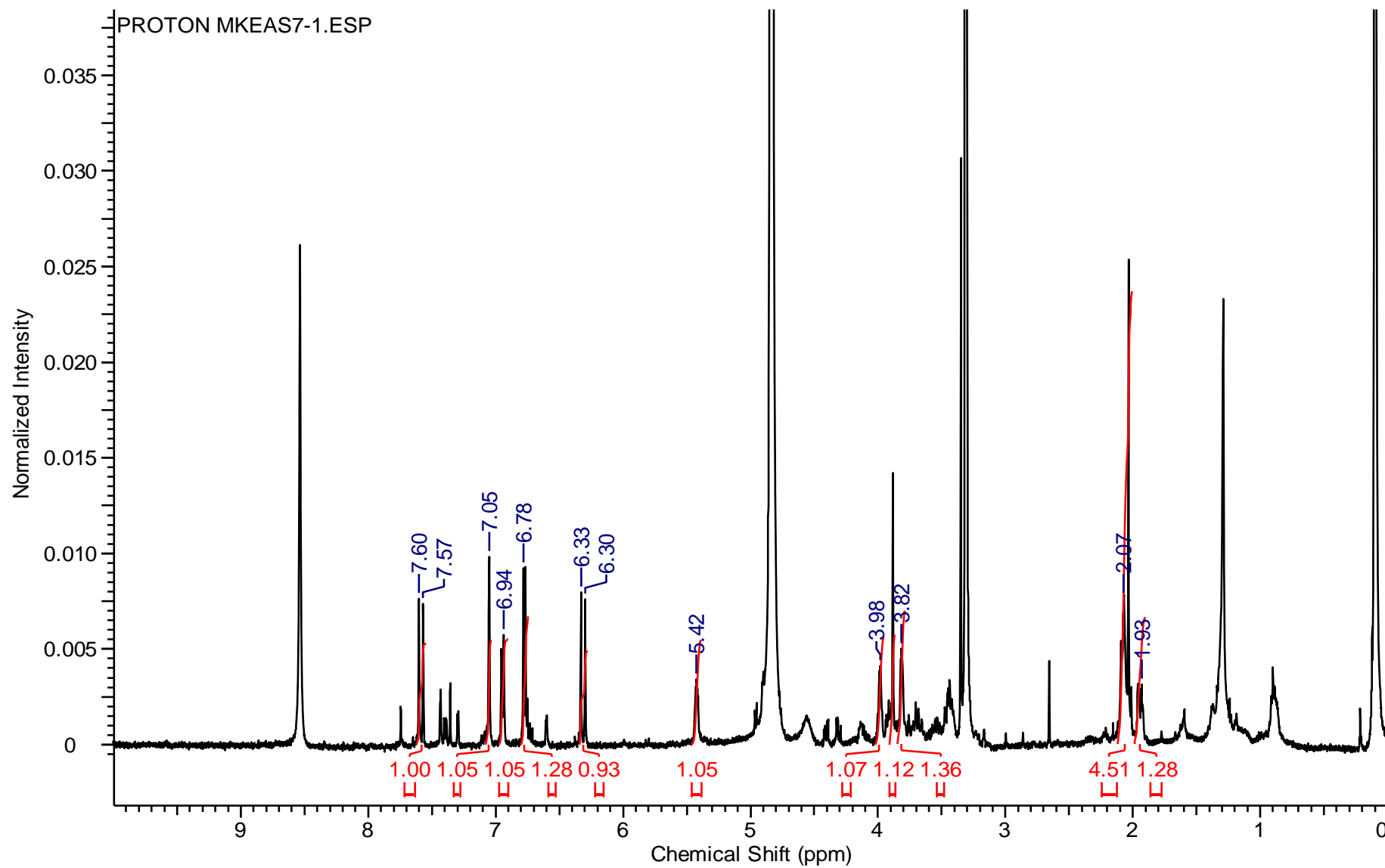


Figura 47 - Espectro RMN-¹H de EAS7-1 em CD₃OD a 500 MHz e 25 °C

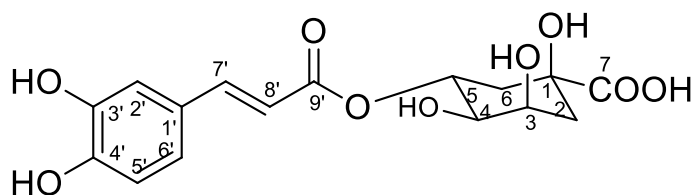


Figura 48 - Estrutura química do ácido neoclorogênico

5.4.4.3 AC34-35-2

Este composto (0,7 mg) é mais um derivado cafeoilquínico. Os espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C foram feitos em CD_3OD à 600 e 150,7 MHz (tabela 13). Foram encontradas evidências da presença do grupo cafeoil com os hidrogênios em δ 7,52 ($\text{H7}'$) e δ 6,22 ($\text{H8}'$), cujas constantes de acoplamento são de 15,8 Hz, assim como os hidrogênios aromáticos δ 7,04 ($\text{H2}'$), δ 6,78 ($\text{H5}'$) e δ 6,95 ($\text{H6}'$) (figura 51). O ácido quínico foi confirmado pela presença dos carbonos metilênicos em δ 37,8 (H2 e H6), pelos carbonos metínicos oxigenados δ 70,0 (C3), δ 71,9 (C5) e δ 72,1 (C4) e pela carboxila em δ 175,2 (figura 50). Um sinal a mais foi encontrado em δ 3,69 (H8) correspondente a uma metila com carbono em δ 52,6 (C8), a qual está ligada a C7 , correlação evidenciada pelo HMBC (figura 52) (ZHU *et al.*, 2005).

As correlações carbono-hidrogênio foram estabelecidas pelo experimento HSQC e HMBC (figuras 50 e 52), e os acoplamentos entre os hidrogênios pelo COSY e NOESY (figuras 49 e 53).

Tabela 13 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN-¹H do composto AC34-35-2

Posição	¹ H	¹³ C	COSY ^a	NOESY ^a	HMBC (¹ H → ¹³ C) ^a
1		75,2			
2	2,20 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 13,3 e 2,9 ax) 2,00 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 13,3 e 6,7 eq)	37,8	H2eq,H3 H2ax	H2eq, H3, H4 H2ax	C7
3	4,13 (<i>m</i> , 1H)	70,0	H2ax, H4	H2ax, H2eq, H4	
4	3,73 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 7,3 e 2,9)	72,1	H3, H5	H3, H2ax	
5	5,27 (<i>m</i> , 1H)	71,9	H4, H6ax	H6ax, H4	
6	2,16 (<i>m</i> , 1H ax) 2,20 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 13,3 e 2,9 eq)	37,8	H5	H5	
7		175,2			
8	3,69 (<i>s</i> , 3H)	52,6			C7
1'		127,2			
2'	7,04 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 1,9)	114,8	H6'	H6', H8'	C3', C4', C6'
3'		146,5			
4'		149,6			
5'	6,78 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 8,2)	116,3	H6'		C1', C3'
6'	6,95 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 8,2 e 1,9)	122,9	H2', H5'	H5', H8'	C2', H4'
7'	7,52 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 15,8)	147,1	H8'	H6', H8'	C6'C8', C9'
8'	6,23 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 15,8)	114,8	H7'	H2', H7'	C1'
9'		167,8			

(a) - Correlações fracas são marcadas em itálico

O espectro de massas de alta resolução revelou um *m/z* de 367,1035 [*M* - H]⁻ (calculada 367,1029) correspondendo à fórmula molecular C₁₇H₁₉O₉⁻, confirmado a presença de um grupo metila no esqueleto cafeoilquínico (figura 54). O poder rotatório foi medido em [α]_D²⁰ = -1,43° (*c* 0,1 mg/100mL, MeOH). Por comparação com dados a literatura este composto foi identificado como o ácido-5-O-cafeoilquínico-metil-éster, ou éster metílico do ácido neoclorogênico (figura 55) (LIN, YANG e CHOU, 2002; CHOI *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2009).

Os três compostos derivados do ácido clorogênico são descritos pela primeira vez nos extratos de *Rourea induta*. Essas substâncias já são amplamente conhecidas e descritas na literatura, principalmente por serem antioxidantes naturais que possuem aplicação na medicina, nutrição e cosméticos (CHAN *et al.*, 2009).

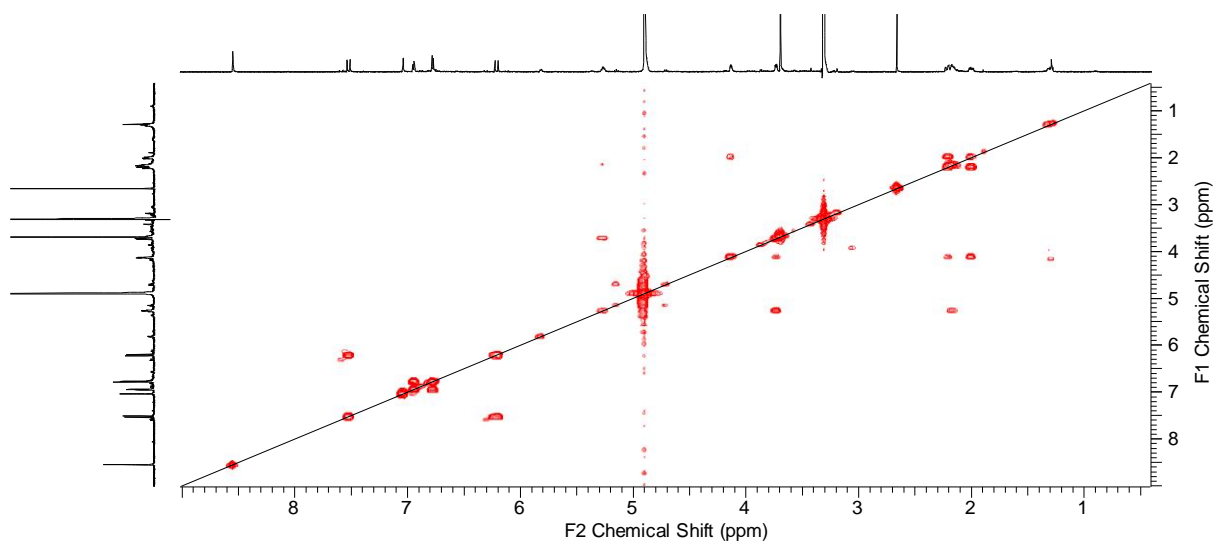


Figura 49 - Espectro COSY de AC34-35-2

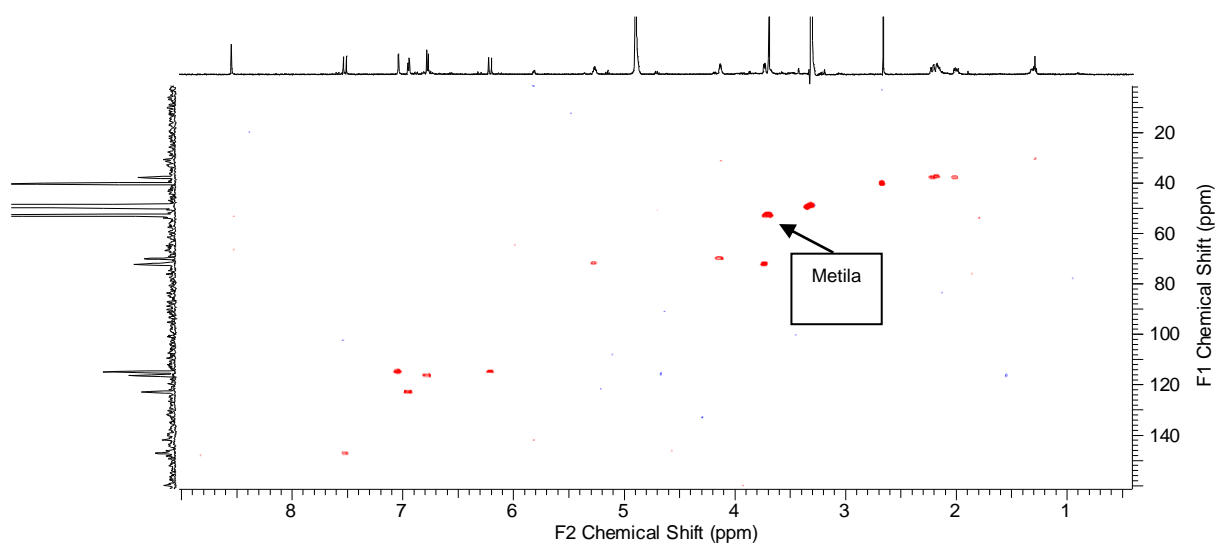


Figura 50 - Espectro HSQC de AC34-35-2

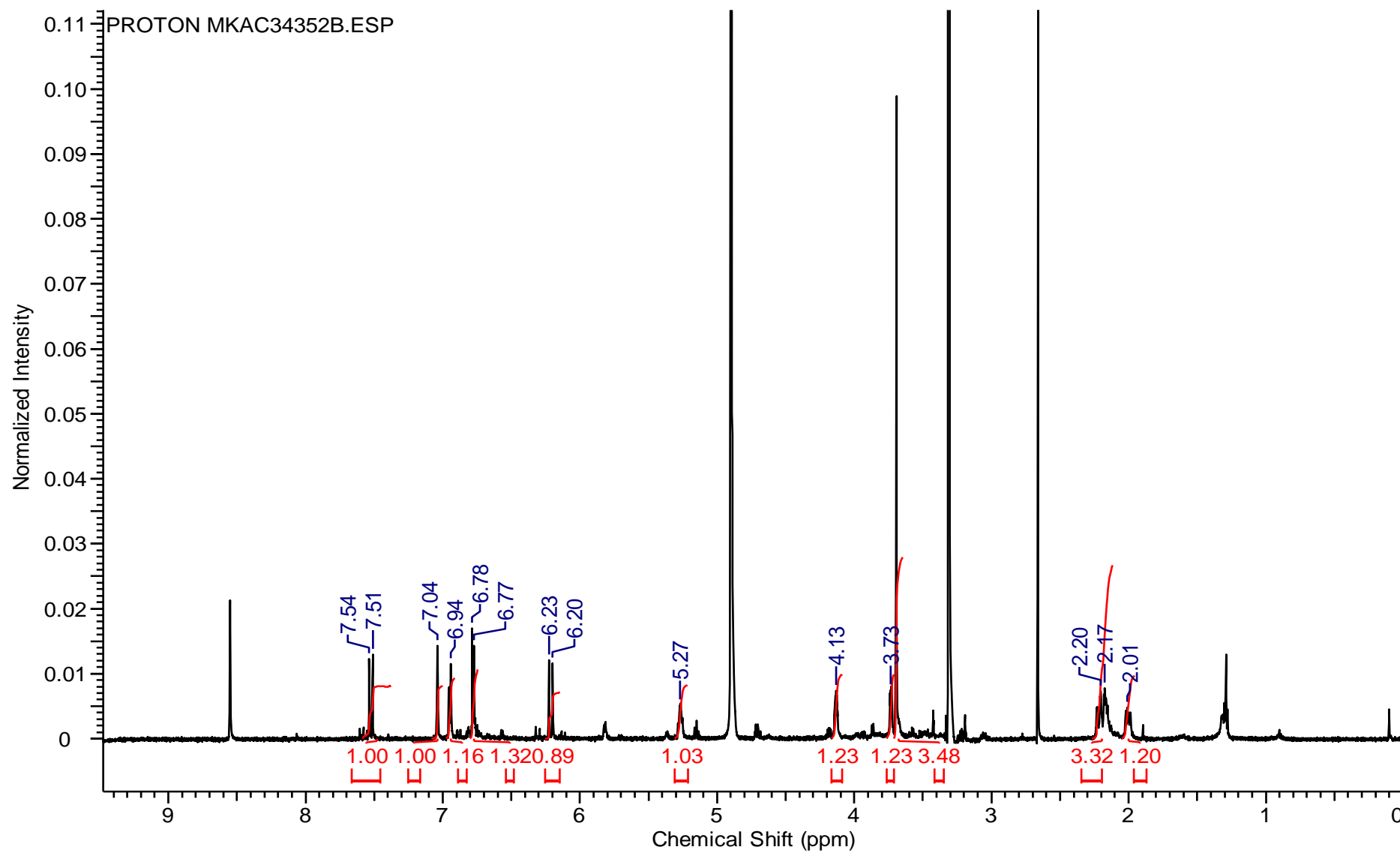


Figura 51 - Espectro RMN- ^1H de AC34-35-2 em CD_3OD a 600 MHz e 25 °C

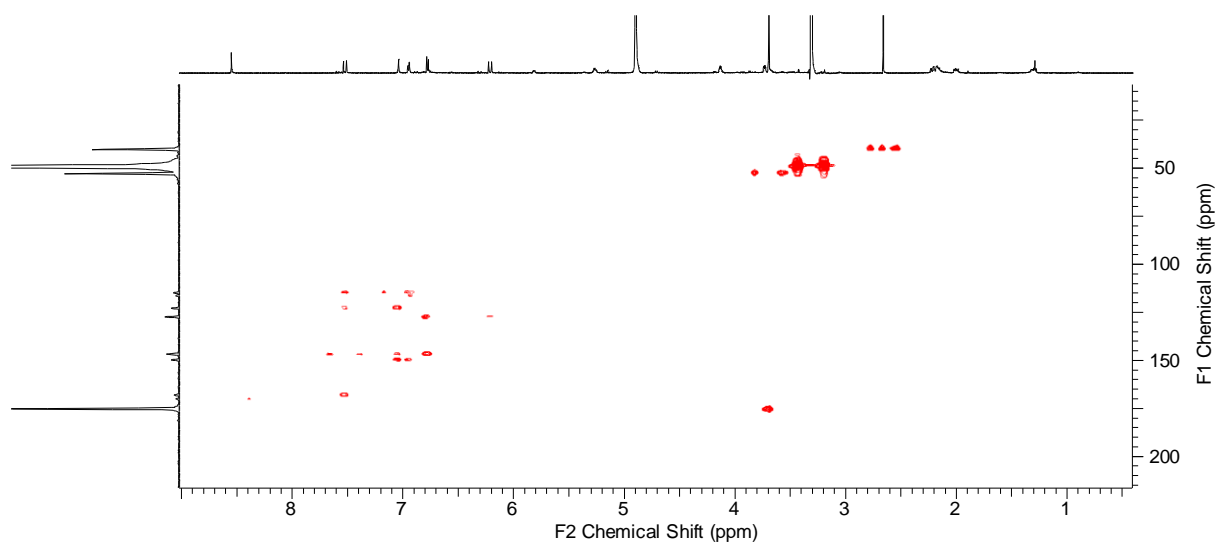


Figura 52 - Espectro HMBC de AC34-35-2

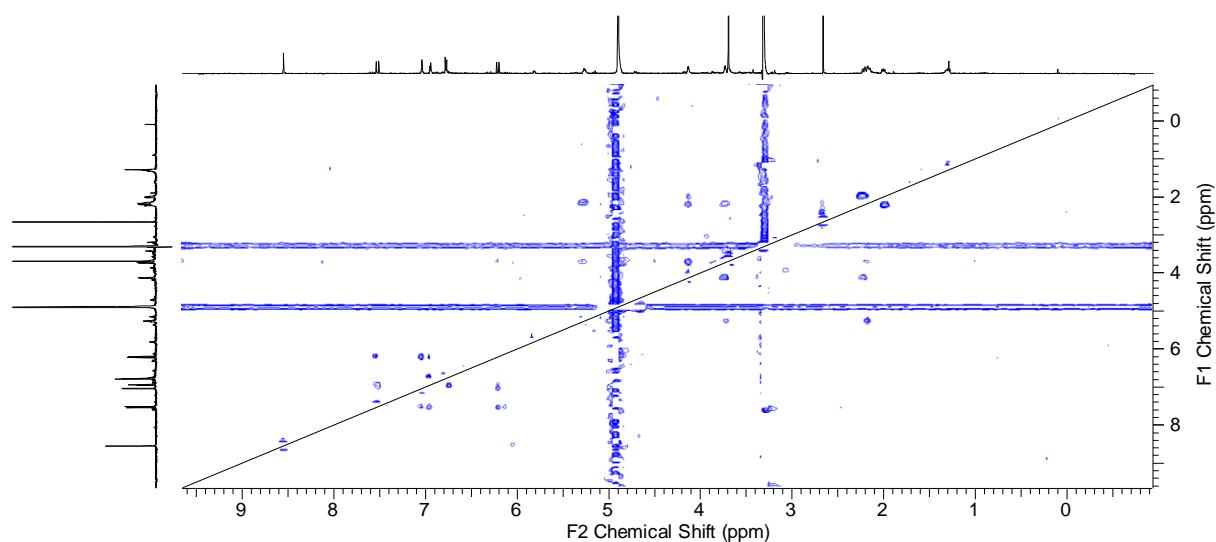


Figura 53 - Espectro NOESY de AC34-35-2

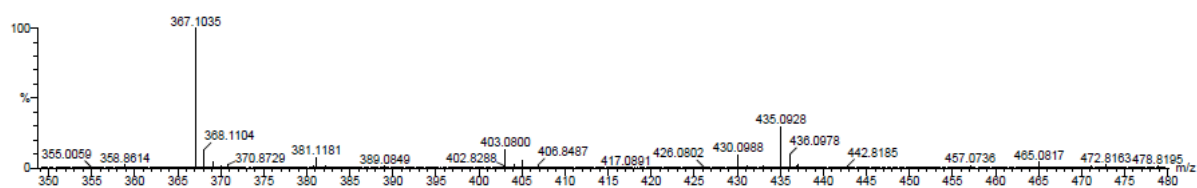


Figura 54 - Espectro de massa (ES-) AC34-35-2

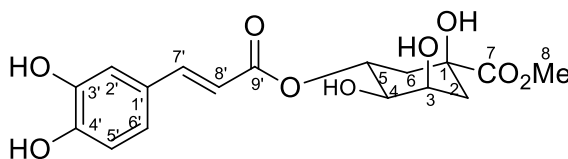


Figura 55 - Estrutura química do éster metílico do ácido neoclorogênico

5.4.4.4 Determinação da configuração dos derivados do ácido clorogênico

Considerando que os valores da carboxila (C7) estavam com um deslocamento pequeno em relação aos dados encontrados na literatura, principalmente para o ácido clorogênico (EAS7-2), foi necessária uma confirmação da configuração da parte quínica dos compostos isolados derivados do ácido clorogênico. Para o composto EAS7-2 experimentalmente achou-se δ 172,5 e na literatura têm-se valores em torno de δ 180 (CHAN *et al.*, 2009), uma diferença que levou a pensar que esta carboxila estivesse em conformação axial, diferente da comumente encontrada nesses compostos. Para tanto foi sintetizada a lactona triacetato (figura 56) que possui este grupamento axial. Esta molécula, assim como o ácido clorogênico comercial e os três compostos acima descritos (EAS7-1, EAS7-2 e AC34-35-2), foram saponificados para liberação do anel quínico, posteriormente todos, juntamente com o ácido quínico comercial, foram derivatizados (sililação) para se tornarem voláteis, e então analisados por CG-MS para comparação dos resultados obtidos entre os compostos isolados e os comerciais.

Para todos os compostos o íon encontrado em maior quantidade foi o correspondente a 344,4 (figura 57), e o que diferenciou os compostos foi o tempo de retenção deste íon, como pode ser observado na figura 58. O ácido quínico, o ácido clorogênico comercial e os três compostos isolados apresentaram o mesmo tempo de retenção para este pico, em torno de 24,75 min, já a lactona sintetizada apresentou um maior tempo de retenção, em torno de 25,2 min, indicando, portanto, que este é o único composto diferente. Dessa maneira conclui-se que, as três moléculas isoladas possuem a conformação equatorial do seu grupamento carboxila, igual ao ácido clorogênico encontrado comercialmente.

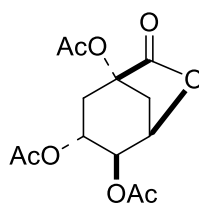


Figura 56 – Estrutura química da lactona triacetato

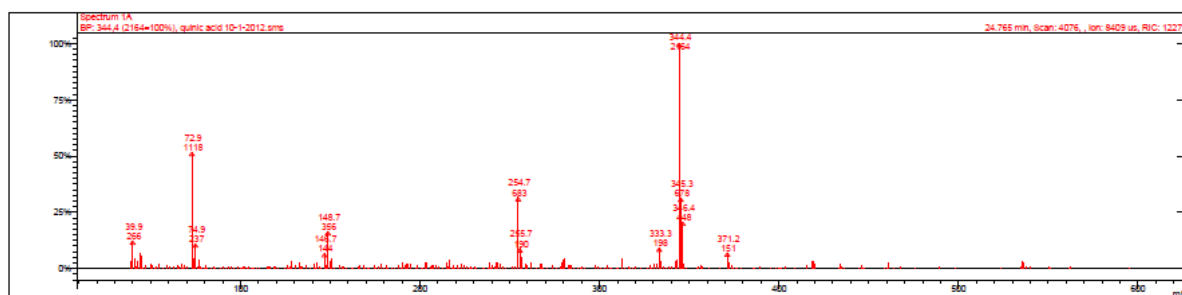


Figura 57 – Espectro de CG/MS do ácido quínico comercial

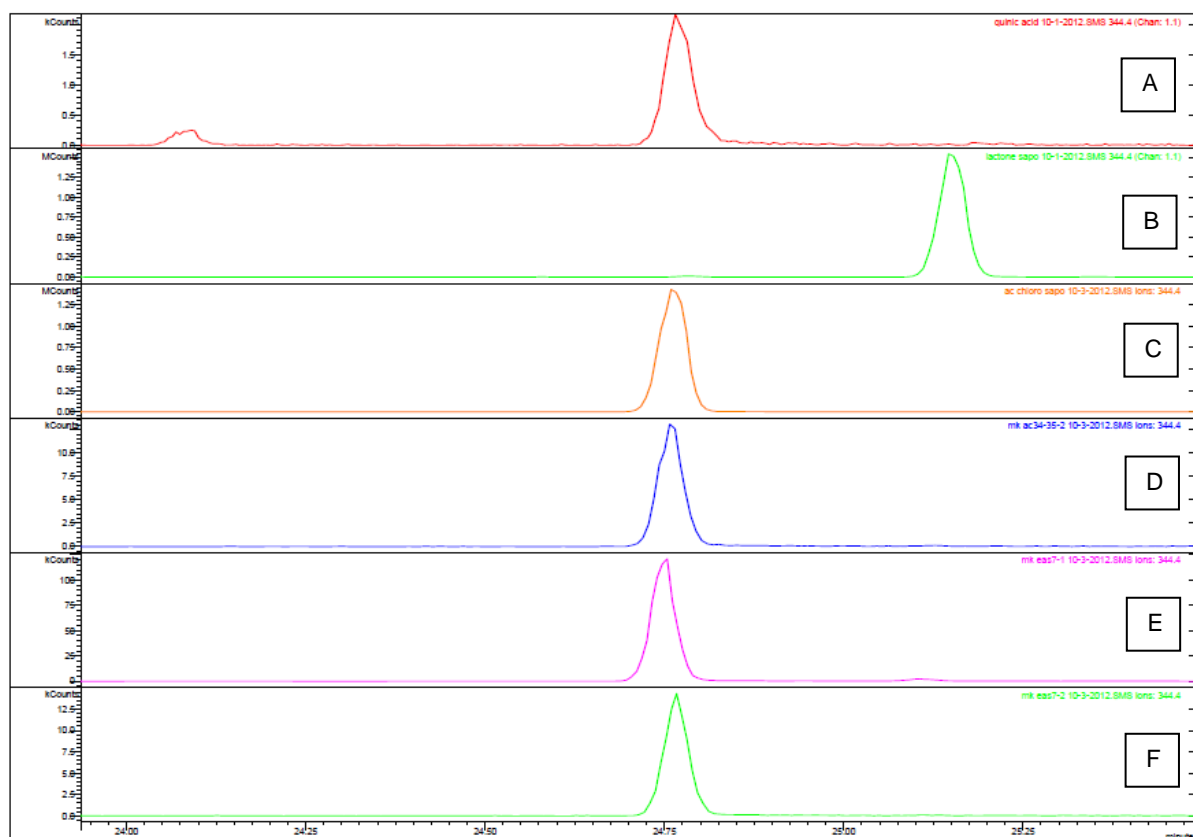


Figura 58 – Expansão do cromatograma do íon 344,4 em CG/MS para os derivados do ácido clorogênico.

A= ácido quínico comercial; B= lactona; C= ácido clorogênico comercial; D= éster metílico do ácido neoclorogênico (AC34-35-2); E= ácido neoclorogênico (EAS7-1); F= ácido clorogênico (EAS7-2)

5.4.5 Megastigmanos

5.4.5.1 CP1-1

Este composto (1,0 mg) foi obtido como um pó amorfo incolor, seus espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C foram feitos em CD₃OD em 600 e 150,7 MHz, respectivamente (tabela 14). O espectro RMN-¹H revelou um sinal em δ 5,87 (H4) correspondente a um hidrogênio oleofínico, e outros dois em δ 5,98 (H7) e δ 5,73 (H8), ambos com uma constante de acoplamento de $J = 15,7$ Hz indicando uma ligação dupla com configuração *trans*. Três singletos referentes a três metilas foram identificadas, em δ 1,95 (H13) e duas metilas geminais em δ 1,01 (H12) e δ 1,04 (H11) ligadas a um carbono quaternário. O dubleto em δ 1,29 (H10), integrando para 3 hidrogênios, corresponde também a uma metila, a qual possui uma correlação com o hidrogênio em δ 4,54 (H9), um grupamento metino oxigenado (figura 59). O duplo dubleto em δ 5,73 (H8) indica a presença de um hidrogênio vicinal, confirmado pela correlação no COSY entre ele e o hidrogênio em δ 4,54 (H9) (figura 61). Os sinais em δ 2,17 (H2a) e δ 2,62 (H2b), ambos dubletos com $J = 16,6$ Hz (H2a e H2b, respectivamente), indicam um grupo metileno ligado à carbonila C3 (δ 201,4), o que foi evidenciado pela correlação entre ambos no experimento HMBC (figura 63) (SOHN *et al.*, 2008). A presença da carbonila foi confirmada no espectro de carbono (figura 60). Esses sinais sugerem a presença de um esqueleto de megastigmano, o qual corresponde a um anel ciclohexano substituído nos carbonos 1 (δ 42,6), 5 (δ 167,1), e 6 (δ 80,0), e uma cadeia alifática insaturada com 4 átomos de carbono (C7 δ 133,8; C8 δ 133,9; C9 δ 74,7 e C10 δ 22,4) ligados ao C6, estrutura que pode ser oxigenada em C7 ou C9 (SILVA, 2012).

Um hidrogênio anomérico de grupamento glicosídeo foi evidenciado em δ 4,27 (H1', $J = 7,8$) com uma configuração β , o qual foi identificado, por comparação com dados da literatura, como a glucopiranosose (YAMANO e ITO, 2005; SOHN *et al.*, 2008).

Esta molécula possui dois estereocentros, C9 e C6. A estereoquímica do carbono 9 foi determinada por comparação com dados da literatura, onde tem-se o isômero *S* com um deslocamento químico em δ 74,7 e o *R* em δ 77,0; nos dados

experimentais tem-se C9 em δ 74,7 indicando que este carbono possui configuração S. Para o carbono 6 os deslocamentos químicos para os isômeros *R* e *S* são muito semelhantes, não sendo possível a diferenciação apenas por RMN, portanto o composto foi submetido à análise de dicroísmo circular (CD) e comparação com a literatura para a determinação de sua configuração absoluta. O espectro encontrado para CD do composto CP1-1 apresentou $\Delta\epsilon$ (nm) +2,5 (240) e -0,4 (314) (figura 65), valores semelhantes ao encontrados na literatura para o composto com o carbono 6 com configuração *S* ($\Delta\epsilon$ (nm) +9,6 (242 e -0,44 (317); $\Delta\epsilon$ (nm) +7,8 (240) e -0,71 (316)), confirmando dessa maneira a configuração *S* para C6 (OTSUKA *et al.*, 1995).

Todas as correlações carbono-hidrogênio foram atribuídas pelos experimentos 2D HSQC e HMBC (figuras 62 e 63), e as correlações entre os hidrogênios pela COSY e NOESY (figuras 61 e 64).

Tabela 14 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN-¹H e RMN-¹³C do composto CP1-1

Posição	¹ H	¹³ C	COSY ^a	NOESY ^a	HMBC (¹ H→ ¹³ C) ^a
1	-	42,6			
2	2,17 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 16,6) 2,62 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 16,6)	50,9	H2b H2a, H11	H11 H2a, H4, H8, H11, H12	C3, C3' C1, C3, C11
3	-	201,4			
4	5,87 (<i>s</i> , 1H)	127,2	H13	H2b, H11, H13	C2, C6, C13
5	-	167,1			
6	-	80,0			
7	5,98 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 15,7)	133,8	H8	<i>H2b</i> , H9, H10, H11, H12, H13, H1'	C5, C6, C9
8	5,73 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 15,7 e 7,4)	133,9	H7, H9	H2b, H9, H10, H12, H13, H1'	C6, C7, C9, C10
9	4,54 (<i>ql</i> , 1H, <i>J</i> = 6,7)	74,7	H8, H10	H8, H10, H12, H1'	C8, C10, C1'
10	1,29 (<i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 6,4)	22,4	H9	H7, H8, H9, H1'	C8, C9
11	1,04 (<i>s</i> , 3H)	23,6	H2b	H2a, H2b, H4, H7, H1'	C1, C2, C6, C12
12	1,01 (<i>s</i> , 3H)	24,8		H2b, H7, H8, H9, H1'	C1, C2, C3, C6, C11
13	1,95 (<i>s</i> , 3H)	19,7	H4	H4, H7, H8, H1'	C4, C5, C6
Glucopiranosideo					
1'	4,27 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 7,8)	101,3	H2'	H9, H7, H10, H12, H13, H3', H2', H5'	C9, C3'
2'	3,19 (<i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 8,4)	75,0	H1', H3'	H1', H6'a, H6'b	C1', C3'
3'	3,27 (<i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 8,8)	78,5	H2'	H1'	C4'
4'	3,24 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 8,8)	71,8	H5'	H6'a, H6'b	C3', C5', C6'
5'	3,14 (<i>m</i> , 1H)	78,3	H4', H6'a, H6'b	H1', H6'a	C4', C6'
6'	3,85 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 11,8 e 6,2) 3,63 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 11,8 e 6,2)	62,9	H6'b, H5' H6'a, H5'	H3', H4', H5', H6'b H2', H3', H4', H6'a	C4' C5', C4'

(^a) - Interações fracas são marcadas em itálico

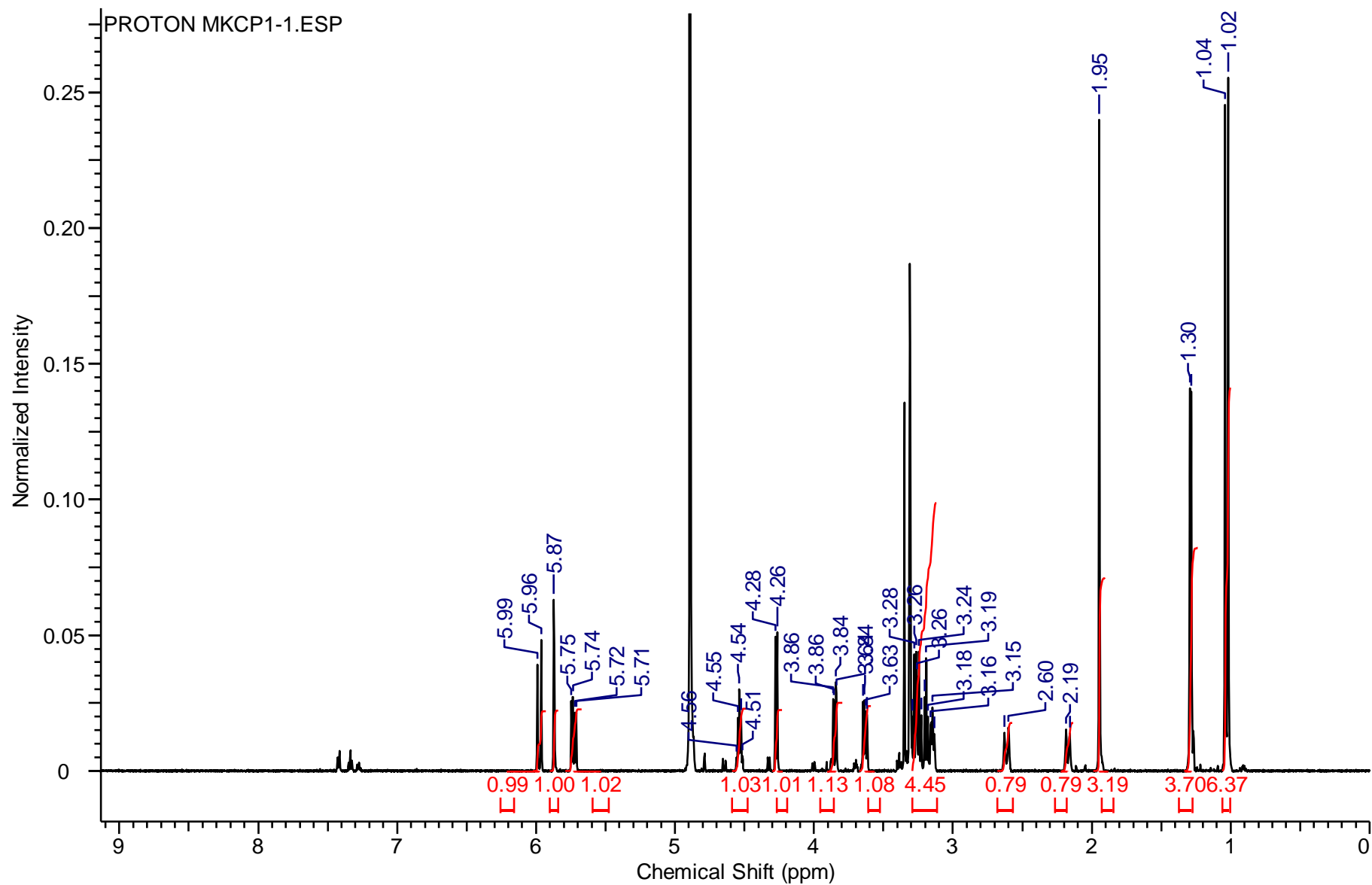


Figura 59 - Espectro RMN-¹H de CP1-1 em CD₃OD a 600 MHz e 25 °C

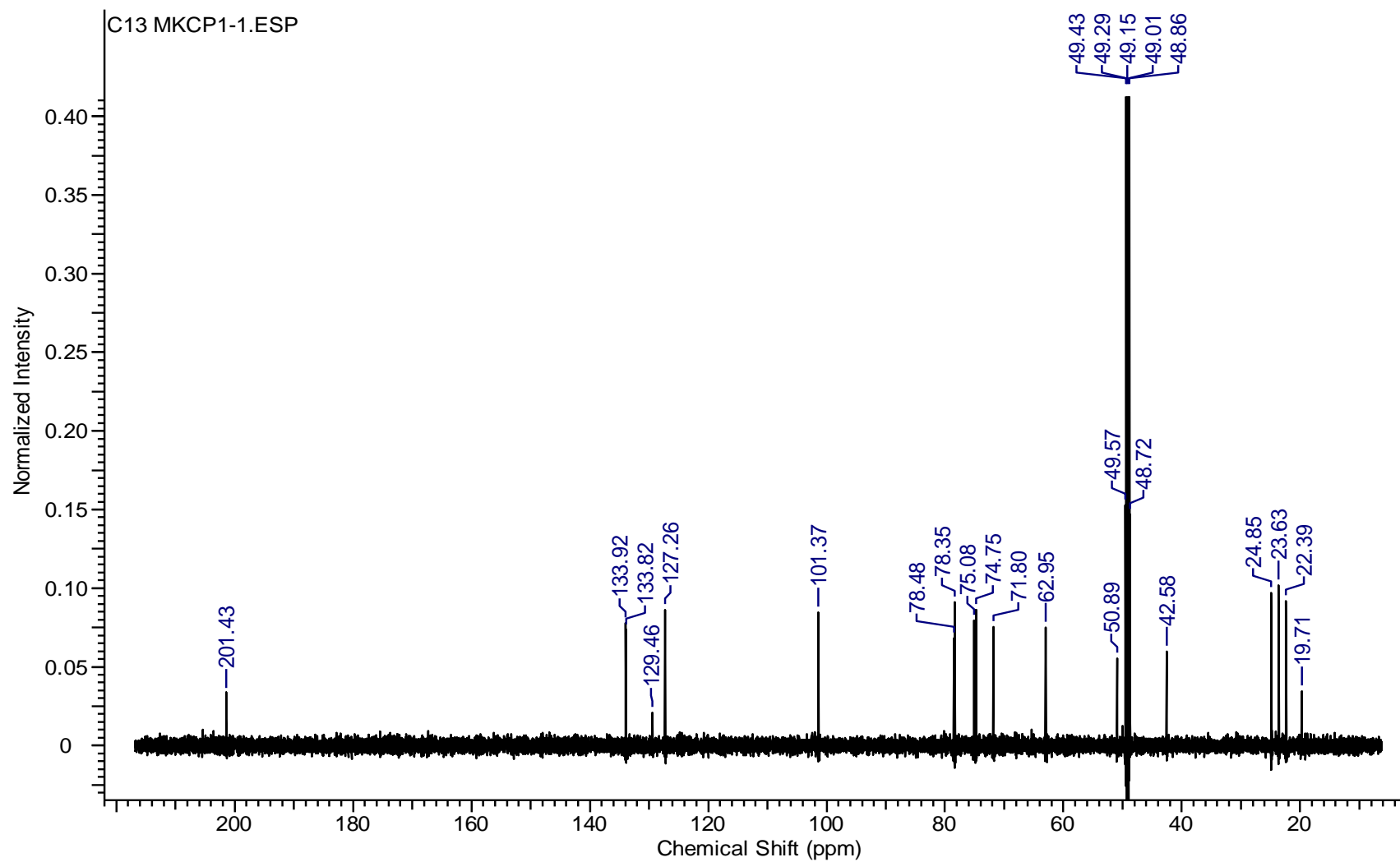


Figura 60 - Espectro RMN- ^{13}C de CP1-1 em CD_3OD a 150,7MHz e 25 °C

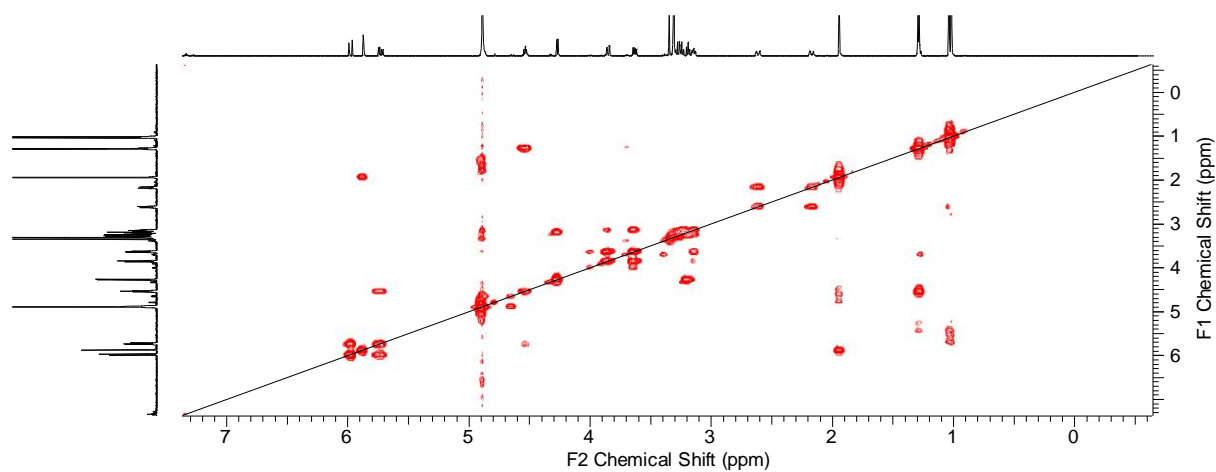


Figura 61 - Espectro COSY de CP1-1

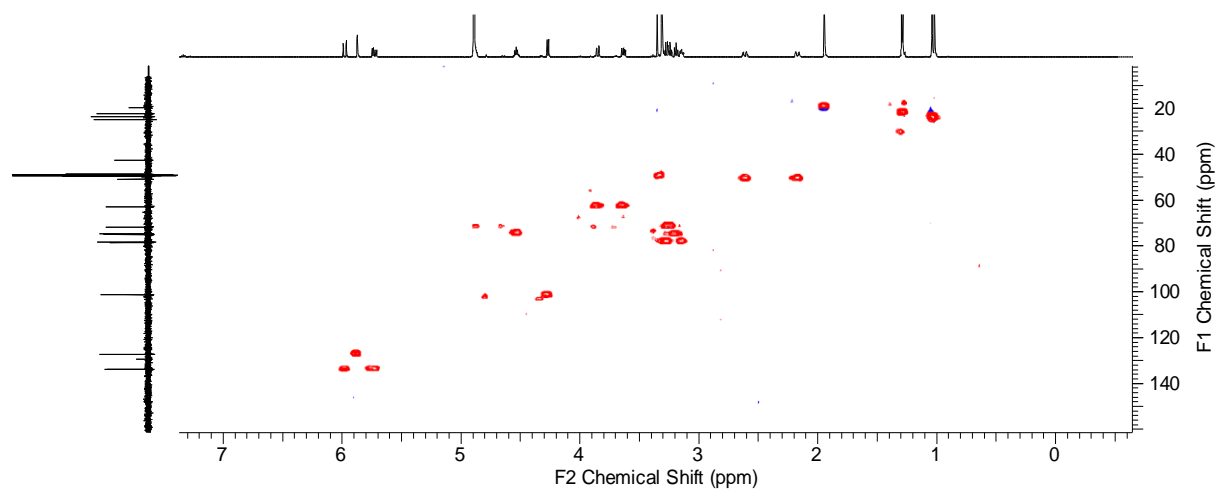


Figura 62 - Espectro HSQC de CP1-1

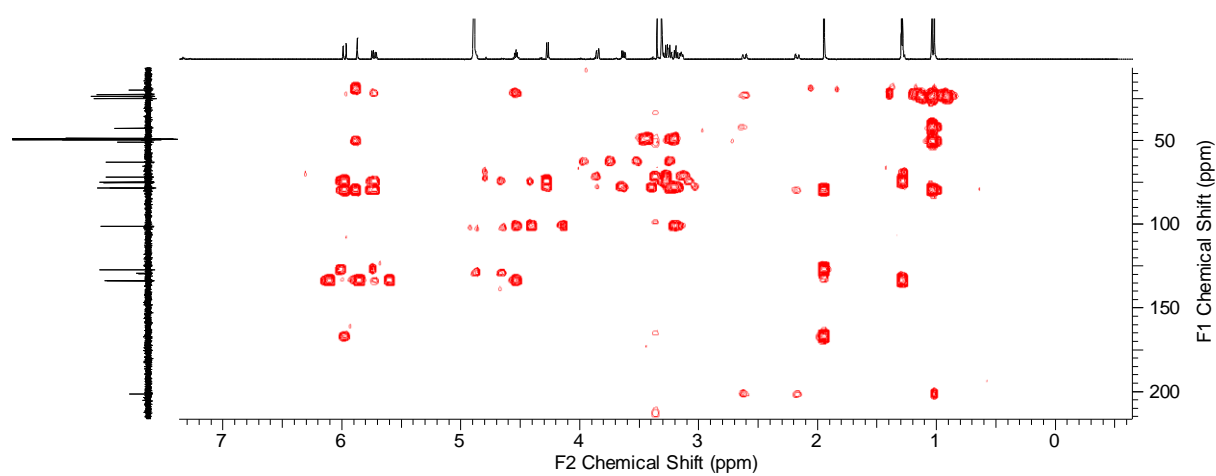


Figura 63 - Espectro HMBC de CP1-1

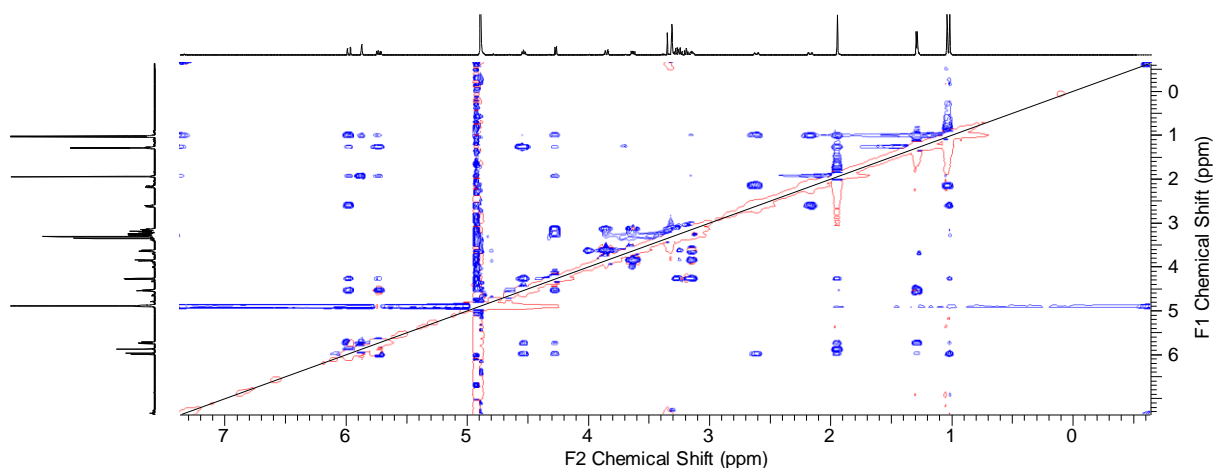


Figura 64 - Espectro NOESY de CP1-1

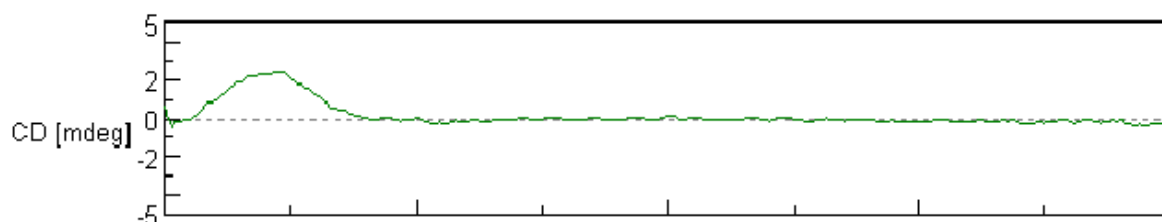


Figura 65 - Dicroísmo circular de CP1-1

Este composto apresentou um íon molecular em massa de alta resolução de m/z 409,1846 $[M+Na]^+$, sendo a massa calculada de 409,1838 correspondente à $C_{19}H_{30}O_8Na^+$ (figura 66). Seu poder rotatório foi medido em $[\alpha]_D^{20} = +32,5^\circ$ (c 0,1 mg/100mL, MeOH), denso encontrado na literatura $[\alpha]_D^{25} = +74,0^\circ$ (c 0,96, MeOH) (YAMANO e ITO, 2005).

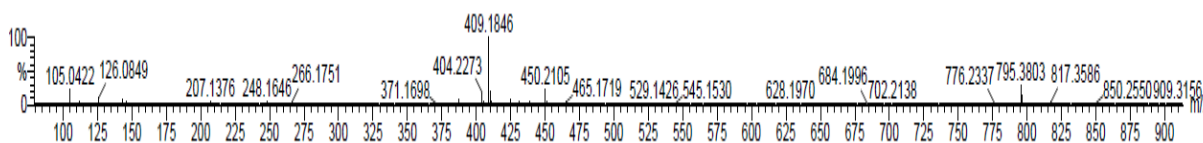


Figura 66 - Espectro de massa (ES+) de CP1-1

Por comparação com dados da literatura o composto CP1-1 foi identificado como o megastigmano glicosídeo (6S,9S)-roseosideo (figura 67), também chamado

de vomifoliol glicosídeo, isolado pela primeira vez nesta espécie (OTSUKA *et al.*, 1995; YAMANO e ITO, 2005; SOHN *et al.*, 2008).

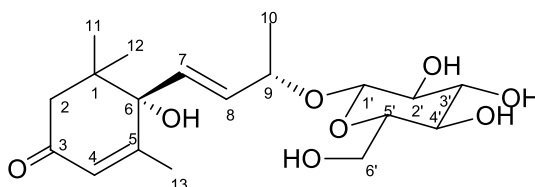


Figura 67 - Estrutura química do (6S,9S) - roseosideo

5.4.5.2 CP1-2

Este composto (1,0 mg) também foi caracterizado como um pó amorfo incolor. Seus espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C foram feitos em CD₃OD em 600 e 150,7 MHz respectivamente. Os resultados encontrados revelaram espectros muito semelhantes ao composto CP1-1, a mesma estrutura de roseosideo foi encontrada para CP1-2 (tabela 15). O hidrogênio H4 em δ 5,87 está presente, assim como os outros hidrogênios oleofínicos H7 e H8 em dupla ligação com configuração *trans*, ambos em δ 5,86, as metilas geminais (H11 e H12) em δ 1,03 e δ 1,04 e a metila em δ 1,29 (H10), a qual está acoplada ao carbono 9, onde se encontra a única diferença quando comparados com o espectro do (6S,9S)-roseosideo (figura 69). Neste composto, o C9 se encontra com um deslocamento químico de δ 77,4, acoplado ao hidrogênio em δ 4,42, o que indica que esta molécula provavelmente é o outro estereoisômero do roseosideo. Os sinais da unidade glicosídica confirmam ser a glucopirranose (figura 70).

Ao se comparar com a literatura, concluiu-se que CP1-2 corresponde ao isômero (6S,9R)-roseosideo, pois como se discutiu anteriormente o deslocamento em δ 77,0 para C9 corresponde ao isômero *R* deste carbono (SOHN *et al.*, 2008). Para a confirmação da configuração do carbono 6 o composto foi submetido ao dicróismo circular, para o qual se encontraram valores de $\Delta\epsilon$ (nm) +4,8 (240) e -0,4 (313) (figura 68), correspondendo à literatura como o isômero *S* ($\Delta\epsilon$ (nm) +9,6 (242 e

-0,44 (317); $\Delta\epsilon$ (nm) +7,8 (240) e -0,71 (316)) (OTSUKA *et al.*, 1995), confirmando se tratar do (6*S*,9*R*)-roseosideo (figura 71).

Os roseosideos também ainda não haviam sido descritos nesta espécie, esses compostos podem estar relacionados ao aroma das folhas, a inibição da liberação de histamina (YAMANO e ITO, 2005) e a atividade anti-inflamatória da espécie, uma vez que inibem a produção de NO por macrófagos e a liberação de leucotrienos em mastócitos (QIU *et al.*, 2008; YAJIMA *et al.*, 2009).

Tabela 15 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN-¹H e RMN-¹³C do composto CP1-2

Posição	¹ H	¹³ C
1	-	42,6
2	2,15 (<i>d</i> , 1Ha, <i>J</i> = 17,0) 2,52 (<i>d</i> , 1Hb, <i>J</i> = 17,0)	50,8
3	-	201,4
4	5,87 (<i>s</i> , 1H)	127,3
5	-	167,4
6	-	80,1
7	5,86 (<i>sl</i> , 1H)	131,7
8	5,86 (<i>sl</i> , 1H)	135,5
9	4,42 (<i>m</i> , 1H)	77,4
10	1,29 (<i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 6,4)	21,3
11	1,03 (<i>s</i> , 3H)	23,5
12	1,04 (<i>s</i> , 3H)	24,8
13	1,92 (<i>s</i> , 3H)	19,7
1'	4,34 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 7,8)	102,9
2'	3,17 (<i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 8,1)	75,3
3'	3,34 (<i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 8,6)	78,2
4'	3,25 (<i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 9,6)	71,7
5'	3,23 (<i>m</i> , 1H)	78,1
6'	3,85 (<i>dd</i> , 1Ha, <i>J</i> = 11,8 e 1,6) 3,62 (<i>dd</i> , 1Hb, <i>J</i> = 11,8 e 5,5)	62,9

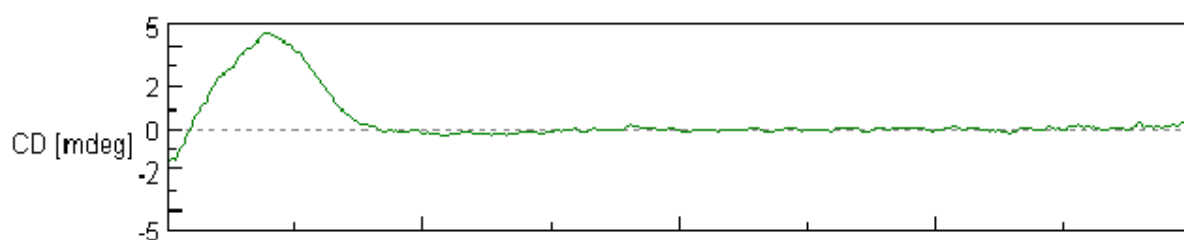


Figura 68- Dicroísmo circular de CP1-2

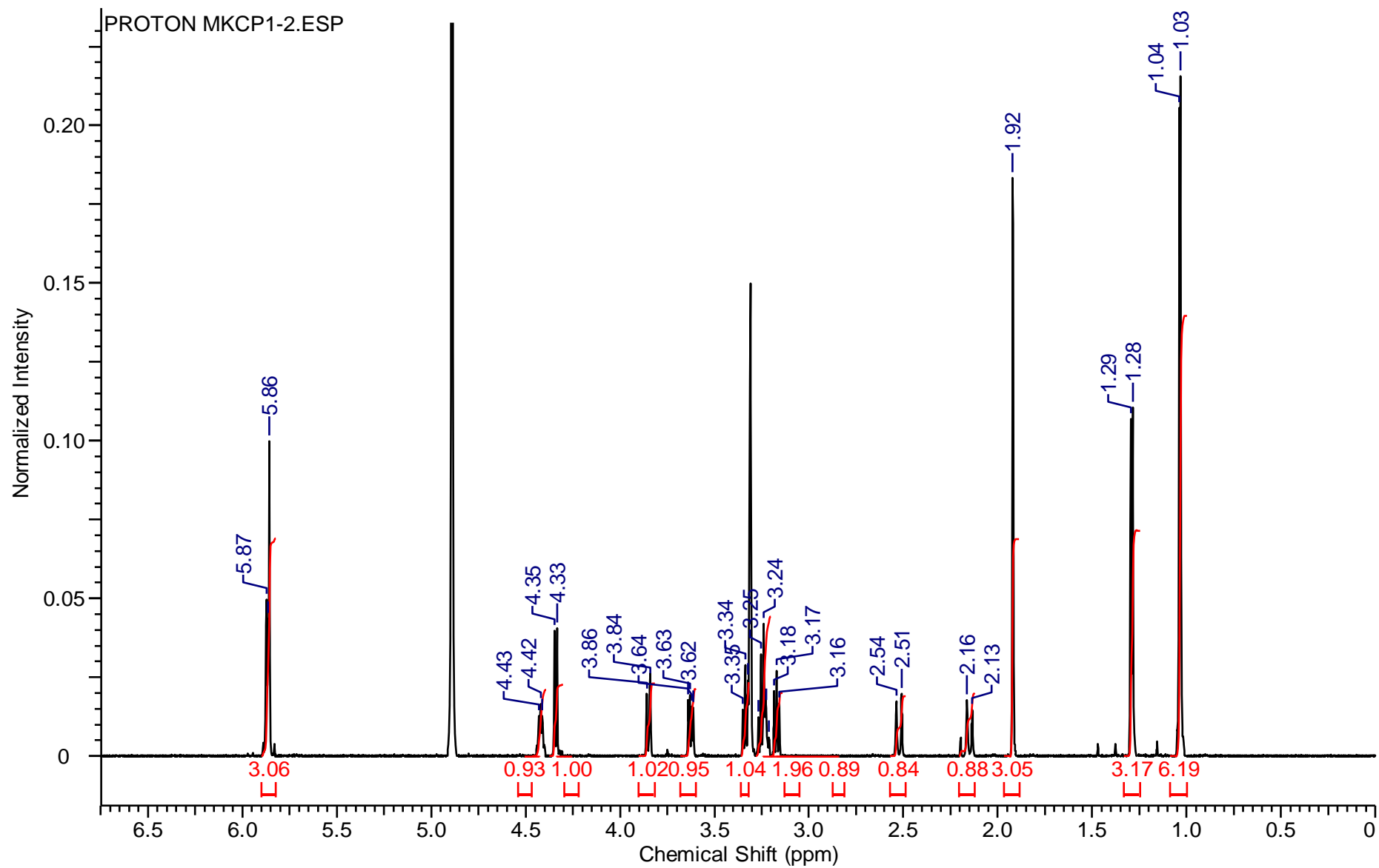


Figura 69 - Espectro de RMN-¹H de CP1-2 em CD₃OD a 600 MHz e 25 °C

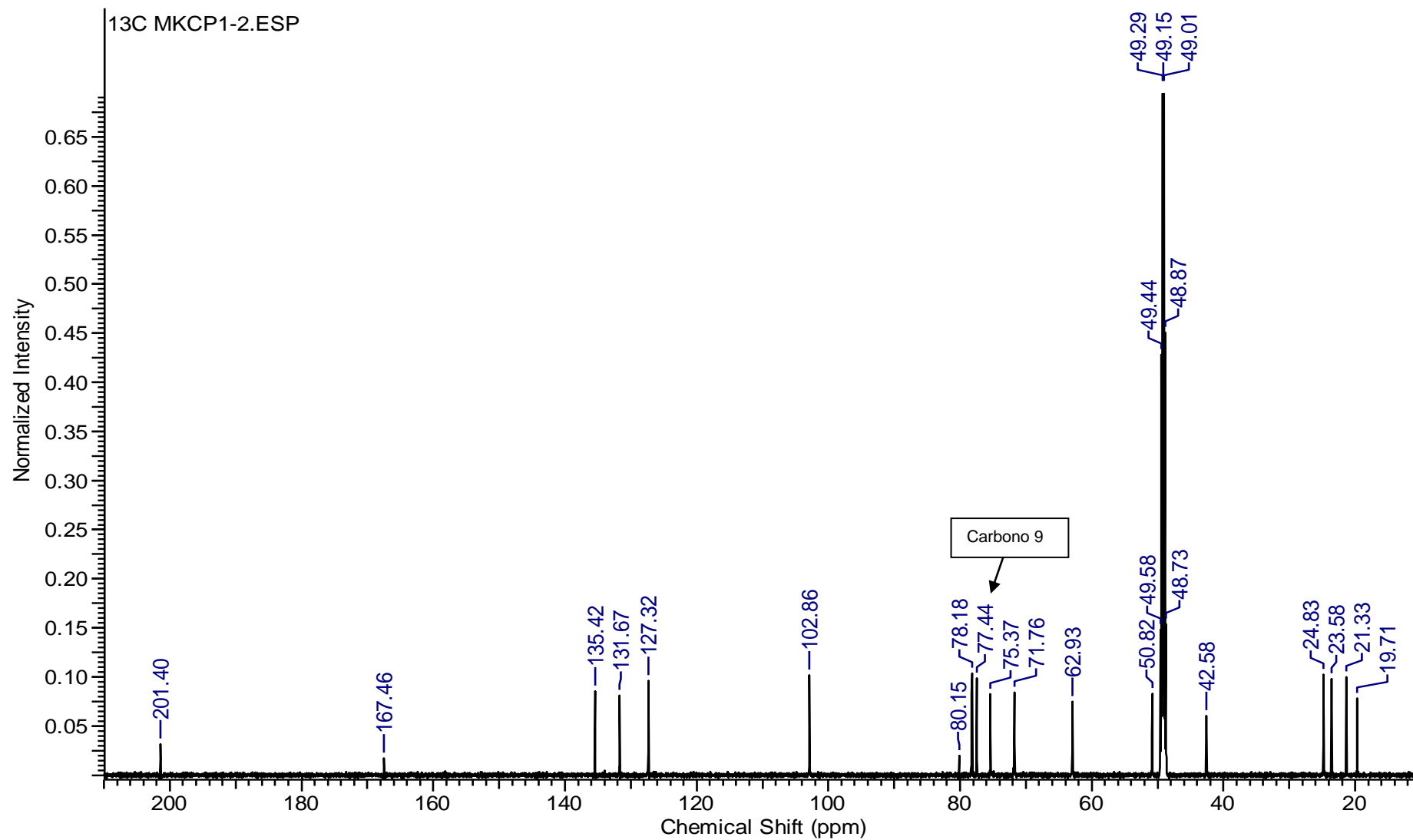


Figura 70 - Espectro de RMN-¹³C de CP1-2 em CD₃OD a 150,7 MHz e 25 °C

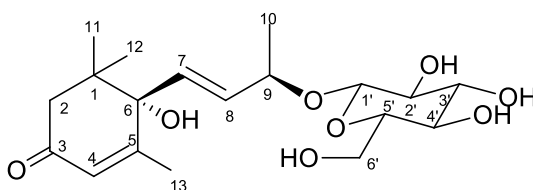


Figura 71 - Estrutura química do (6*S*,9*R*) - roseosideo

5.4.5.3 CPF-1

Este composto (0,9 mg), também isolado da fração clorofórmio filtrada em membrana de poliamida, foi caracterizado como um pó amorfo incolor. Os espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C foram feitos em CD₃OD, em 600 e 150,7 MHz.

Os espectros obtidos apresentaram sinais semelhantes aos do roseosideo com pequenas diferenças (tabela 16). O espectro RMN-¹H revelou um sinal em δ 5,80 (H4) correspondente a um hidrogênio vinílico. Três singletos referentes a três metilas foram identificados, em δ 2,05 (H13) uma metila próxima a uma dupla ligação, e duas metilas geminais em δ 1,10 (H12) e δ 1,02 (H11) ligadas a um carbono quaternário (figura 74). O duplo dubleto em δ 1,25 (H10) corresponde a uma metila que possui uma correlação com o hidrogênio em δ 3,82 (H9), um grupamento metínico oxigenado, correlação evidenciada pelo COSY (figura 75). Os multipletos em δ 1,64 (H8a) e δ 1,67 (H8b) correspondem a um grupo metileno do carbono em δ 37,5 (C8), relação marcada pelo HSQC (figura 72), bem como os multipletos em δ 1,81 (H7a) e δ 1,68 (H7b), os quais correspondem ao metileno do carbono em δ 26,7 (C7). Neste ponto se encontra a diferença desta estrutura com relação ao roseosideo, pois neste caso não há os hidrogênio oleofínicos em ligação trans, e sim dois grupamentos CH₂, um em C7 e um em C8 (figura 73). Os sinais em δ 2,48 (H2a) e δ 1,98 (H2b), cujas constantes de acoplamento são $J = 17,3$ Hz, indicam um grupo metileno ligado à carbonila C3 (δ 202,4), o que foi evidenciado pela correlação entre ambos no experimento HMBC (figura 76) (MATSUNAMI, OTSUKA e TAKEDA, 2010).

Um hidrogênio anomérico de glicosídeo foi identificado em δ 4,32 (H1', $J = 7,8$ e $2,2$) com uma configuração β , o qual foi identificado, por comparação com dados da literatura, como a glucopiranosose (SCHLIEMANN, AMMER e STRACK, 2008; MATSUNAMI, OTSUKA e TAKEDA, 2010).

Todas as correlações entre hidrogênios foram dadas pelos experimentos COSY e NOESY (figuras 75 e 77), e as correlações carbono-hidrogênio pelos experimentos HSQC e HMBC (figuras 72 e 76).

Esta molécula possui, como o roseosideo, dois estereocentros, em C6 e C9. Para a determinação da sua configuração absoluta definiu-se o C9 através dos deslocamentos químicos encontrados para o RMN- ^{13}C , a configuração S é dada por um deslocamento de δ 74,0 e a R em δ 77,0, neste caso temos para o composto CPF-1 um C9 em δ 77,8, o que confirma a configuração R deste carbono. Para o carbono 6 sua configuração foi possível através do dicroísmo circular, onde se obteve $\Delta\epsilon$ (nm) +1,9 (235) e +0,5 (330) (figura 78), valores semelhantes à literatura $\Delta\epsilon$ (nm) +3,28 (237); +1; +0,68 (332) e +2,35 (235) correspondendo à configuração R do carbono 6 (TAKEDA *et al.*, 1997; MATSUNAMI, OTSUKA e TAKEDA, 2010).

Esta molécula apresentou íon molecular com massa de alta resolução de m/z 395,2042 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculada 395,2046) correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_7\text{Na}^+$ (figura 79). Seu poder rotatório foi medido em $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +11^\circ$ (c 0,1 mg/100mL, MeOH), próximo ao encontrado na literatura de $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +27,0^\circ$ (c 2,15, MeOH) (SCHLEIMANN, AMMER e STRACK, 2008; MATSUNAMI, OTSUKA e TAKEDA, 2010). Portanto, por comparação com dados da literatura este composto foi identificado como (6*R*,9*R*) - byzantionosideo B (figura 80).

Tabela 16 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN-¹H e RMN-¹³C do composto CPF-1

Posição	¹ H	¹³ C	COSY ^a	NOESY ^a	HMBC (¹ H→ ¹³ C) ^a
1	-	37,6			
2	2,48 (<i>d</i> , 1Ha, <i>J</i> = 17,3) 1,98 (<i>m</i> , 1Hb)	48,2	H2b, H11 H2a	H2b, H6, H7a, H7b, H8b, H11, H12 H2a, H11, H12	C1, C3, C11 C1, C3, C4, C6, C11
3	-	202,4			
4	5,80 (<i>s</i> , 1H)	125,5	H13	H2b, H7a, H11, H13	C2, C6, C13
5	-	169,9			
6	1,96 (<i>s</i> , 1H)	52,7	H7a, H7b	H7a, H7b, H8a, H13 H2a, H6, H7b, H8a, H10, H11, H12	C5, C6, C8 C8, C9
7	1,81 (<i>m</i> , 1Ha) 1,68 (<i>m</i> , 1Hb)	26,8	H6 H6	H6, H10, H12, H13 H7a, H10, H11, H12 H2a, H10, H12	C6, C8, C9 C6, C9
8	1,64 (<i>m</i> , 1Ha) 1,67 (<i>m</i> , 1Hb)	37,6			
9	3,82 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 1,9)	77,8	H10	H8a, H7a, H10, H1'	C7, C8, C10, C1'
10	1,25 (<i>dd</i> , 3H, <i>J</i> = 6,3 e 2,4)	22,1	H9	H8a, H9	C8, C9
11	1,02 (<i>s</i> , 3H)	29,1	H2a	H2b, H2a, H7a H8a, H13	C1, C2, C6, C12
12	1,10 (<i>s</i> , 3H)	27,6		H2a, H2b, H8a	C1, C2, C3, C6, C11
13	2,05 (<i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 2,7)	25,1	H4	H4, H6, H7b, H11	C4, C5, C6
Glucopirranose					
1'	4,32 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 7,8 e 2,2)	104,1	H2', H4'	H2', H3', H5', H9	C9, C2'
2'	3,15 (<i>m</i> , 1H)	75,5	H1', H3'	H1', H3', H4'	C1', C3'
3'	3,35 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 8,8 e 1,6)	78,4	H2'	H1', H2', H4'	C2', C4', C5'
4'	3,27 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 9,7 e 2,4)	71,9	H1'	H2', H3', H6'a, H6'b	C3', C5', C6'a, C6'b
5'	3,26 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 2,4)	78,0	H6'a, H6'b	H1'	C3'
6'	3,86 (<i>m</i> , 1Ha) 3,64 (<i>dd</i> , 1Hb, <i>J</i> = 11,6 e 5,0)	62,9	H6'b, H5' H5', H6'a	H4', H6'b H4'	C4' C4', C5'

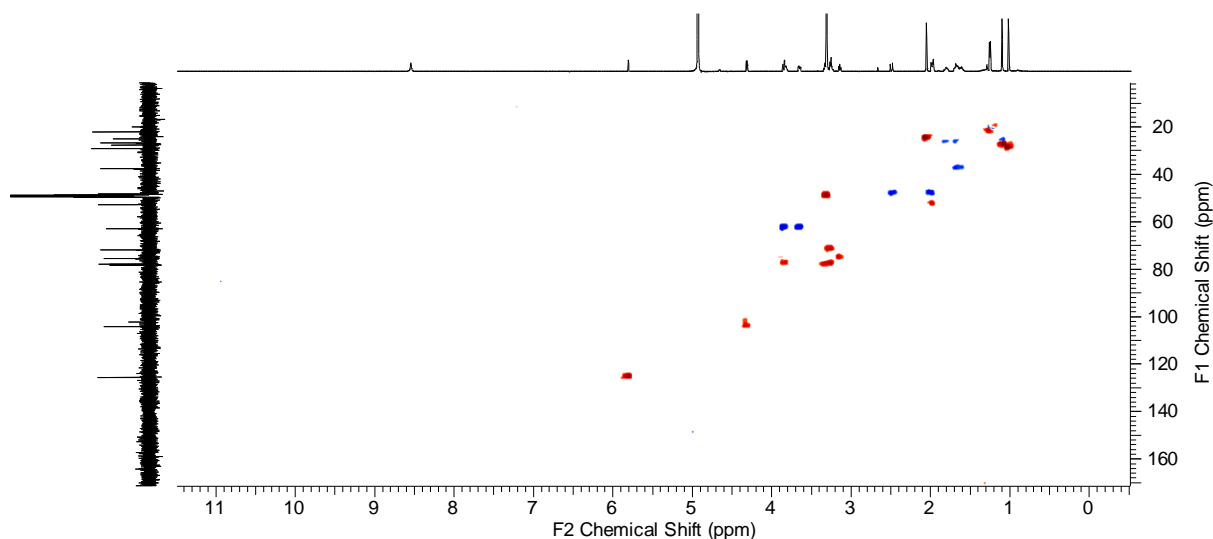
^aInterações fracas são marcadas em itálico

Figura 72 - Espectro HSQC de CPF-1

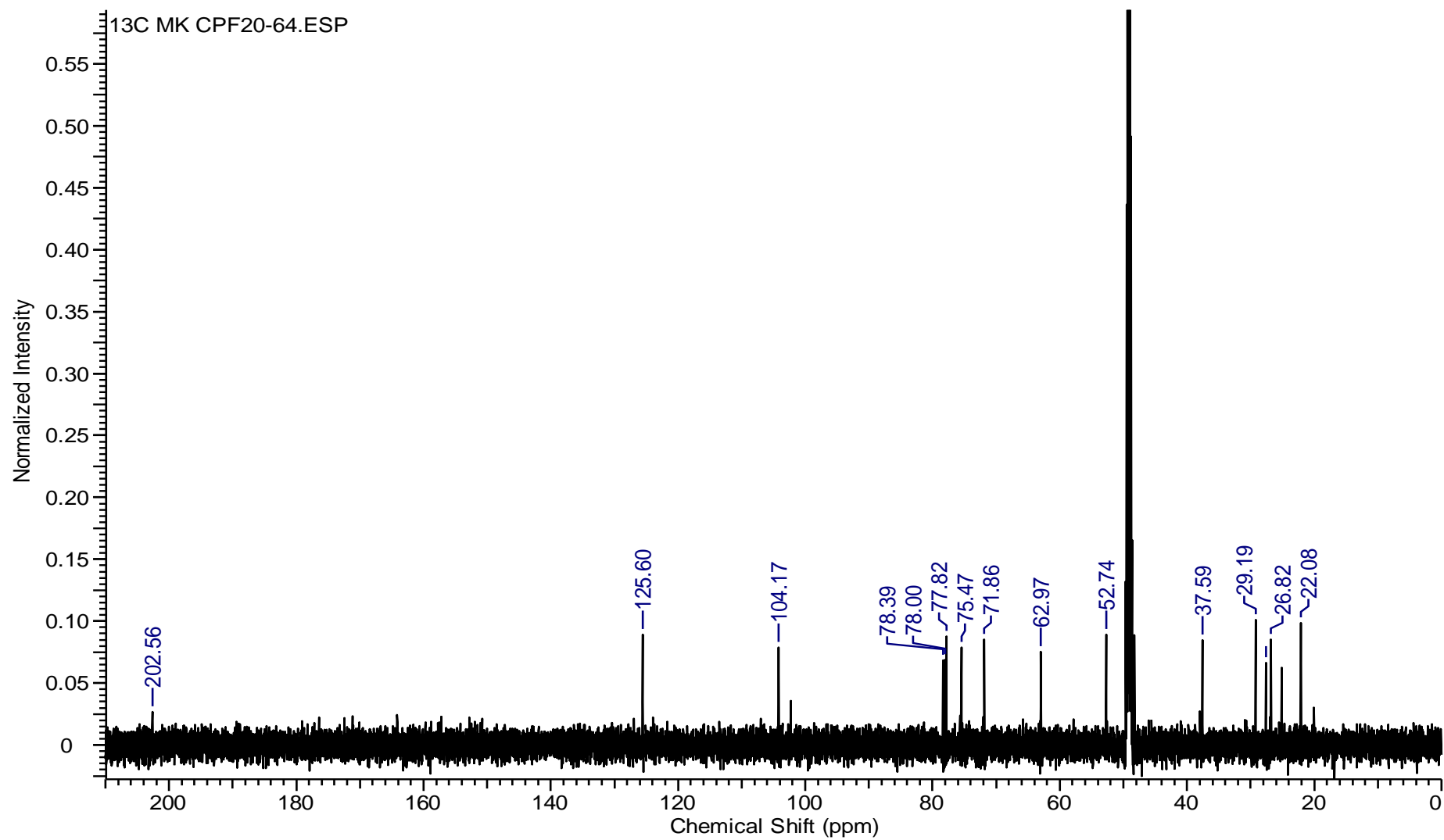


Figura 73 - Espectro RMN-¹³C de CPF-1 em CD₃OD a 150,7 MHz e 25 °C

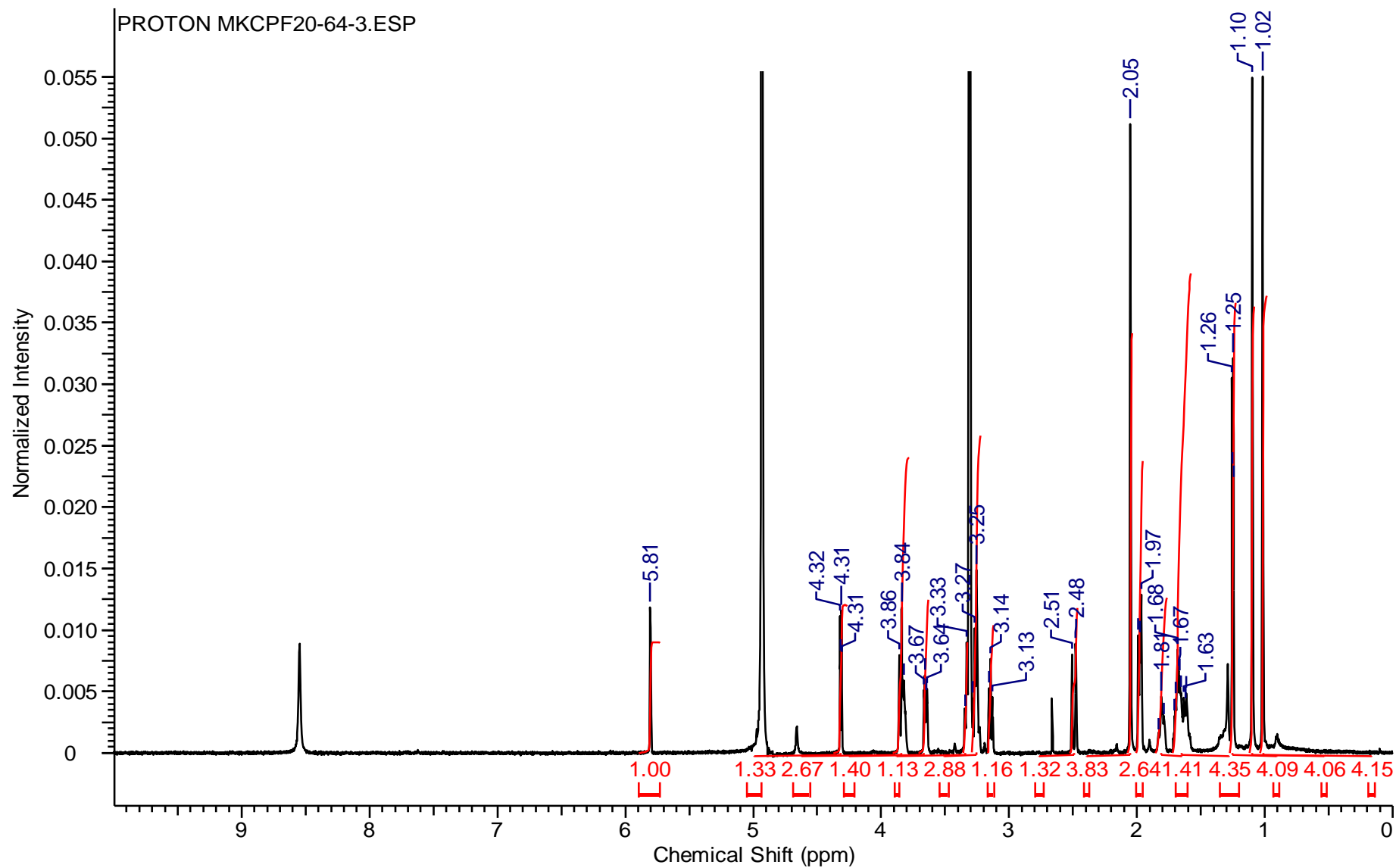


Figura 74 - Espectro RMN-¹H de CPF-1 em CD₃OD a 600 MHz e 25 °C

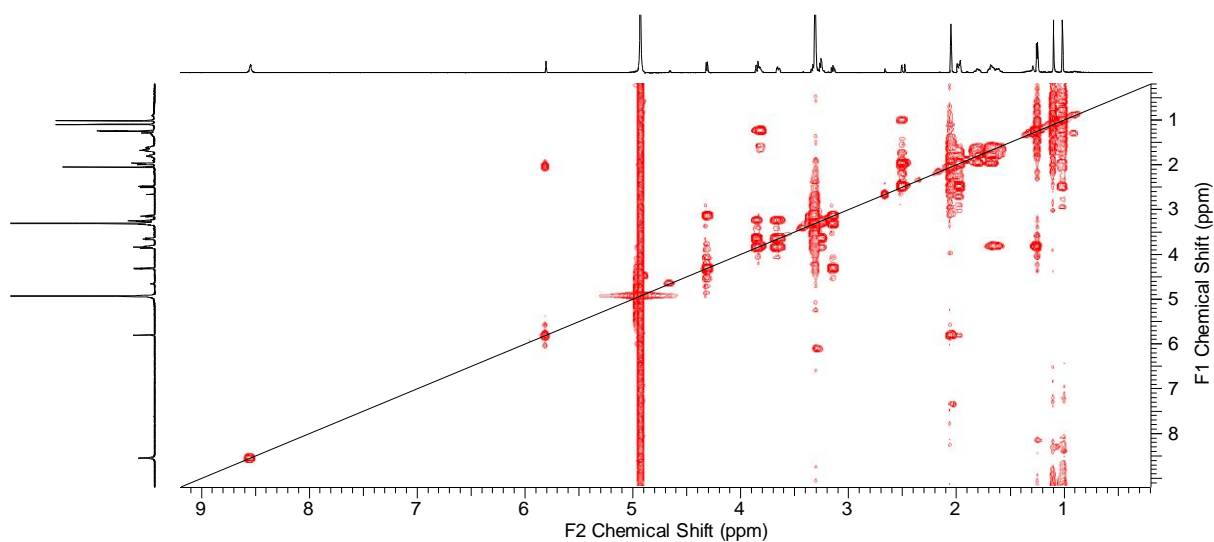


Figura 75 - Espectro COSY de CPF-1

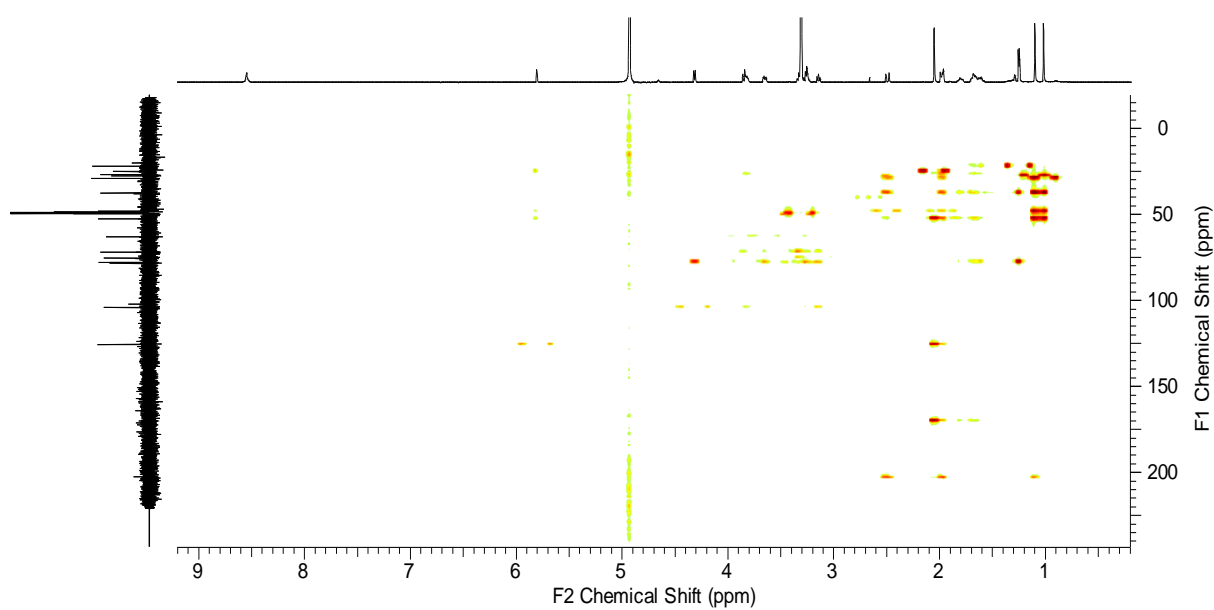


Figura 76 - Espectro HMBC de CPF-1

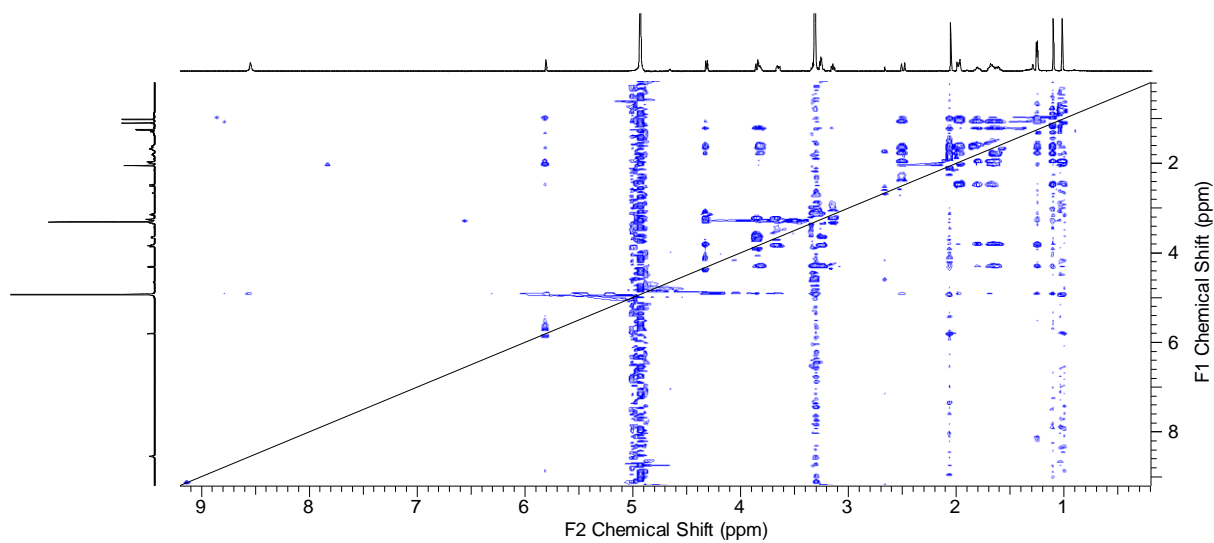


Figura 77 - Espectro NOESY de CPF-1

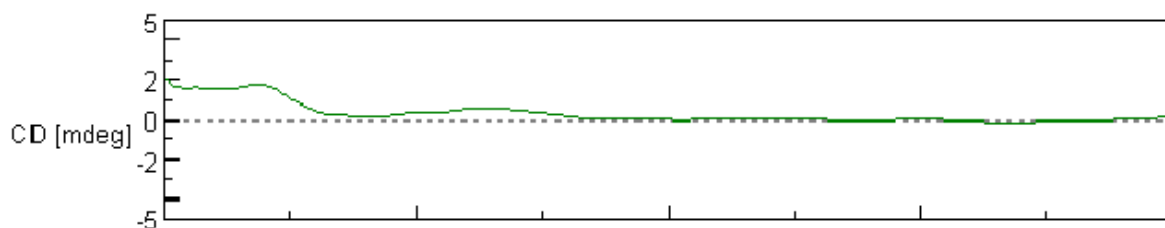


Figura 78 - Dicroísmo circular de CPF-1

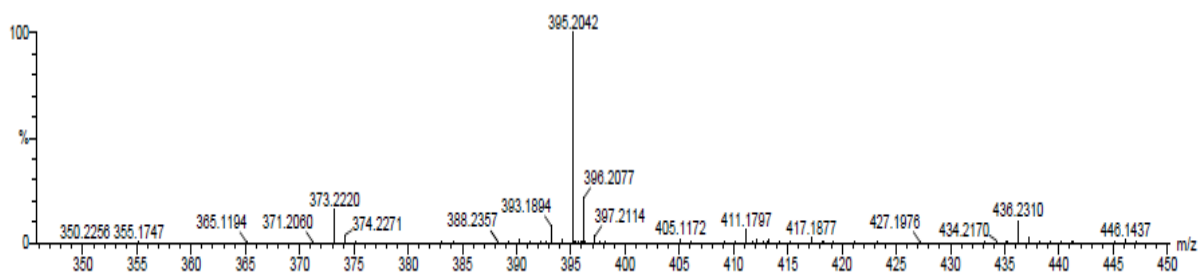


Figura 79 - Espectro de massa (ES+) CPF-1

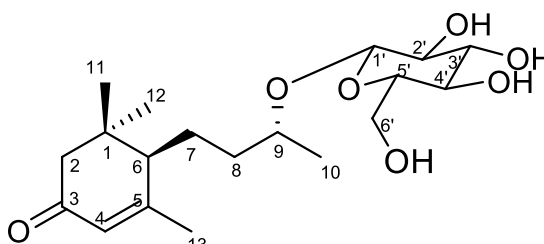


Figura 80 - Estrutura química do (6*R*,9*R*) – byzantionosideo B

5.4.5.4 CPF-2

Esta molécula (0,5 mg) teve a mesma aparência de pó amorfo incolor. Seus espectros RMN- ^1H e RMN- ^{13}C foram processados em CD_3OD a 600 e 150,7 MHz, os quais revelaram uma semelhança muito grande com o byzantionosideo B (figuras 82 e 83). Pequenas diferenças no C9, C10 e C1' foram encontradas, sendo os demais sinais iguais ao composto anterior, o que indica que provavelmente CPF-2 é um estereoisômero do byzantionosideo B, com diferença na configuração dos carbonos anoméricos (tabela 17).

O carbono 9, como discutido anteriormente, possui configuração *S* quando em δ 74,0 e *R* em δ 77,0, portando como se tem neste composto C9 em δ 75,4 conclui-se que ele é o isômero *S*, essa posição deste carbono provocou pequenos deslocamentos nos carbonos C10 (δ 19,60 e C1' (δ 102,1) com relação ao outro isômero. A estereoquímica do carbono 6 foi confirmada pelo o dicroísmo circular, para o qual se encontrou $\Delta\epsilon$ (nm) +0,85 (235) e +0,1(330) (figura 81), (literatura $\Delta\epsilon$ (nm) +0,63 (331) e +4,25 (234)) indicando configuração *R* de C6. Seu poder rotatório foi medido em $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2,0^\circ$ (c 0,1 mg/100mL, MeOH), sendo na literatura encontrado o valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +49,0^\circ$ (c 2,15, MeOH) (MATSUNAMI, OTSUKA e TAKEDA, 2010).

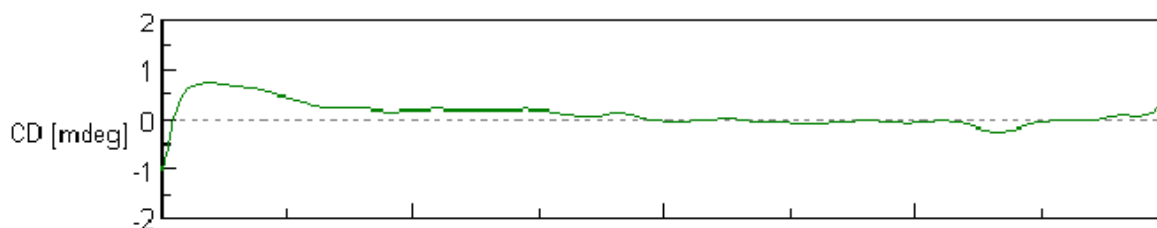


Figura 81 – Dicroísmo circular de CPF-2

Tabela 17 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN-¹H e RMN-¹³C do composto CPF-2

Posição	¹ H	¹³ C
1	-	37,6
2	2,46 (<i>d</i> , 1Ha, <i>J</i> = 17,4) 1,96 (<i>m</i> , 1Hb)	48,0
3	-	202,4
4	5,80 (<i>s</i> , 1H)	125,3
5	-	169,9
6	1,99 (<i>s</i> , 1H)	52,3
7	1,51 (<i>m</i> , 1Ha) 1,97 (<i>m</i> , 1Hb)	26,7
8	1,61 (<i>m</i> , 1Ha) 1,67 (<i>m</i> , 1Hb)	37,6
9	3,89 (<i>m</i> , 1H _a)	75,4
10	1,19 (<i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 6,2)	19,6
11	1,01 (<i>s</i> , 3H)	28,9
12	1,09 (<i>s</i> , 3H)	27,2
13	2,04 (<i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 1,3)	25,1
Glucopirranose		
1'	4,33 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 7,7)	102,1
2'	3,14 (<i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 9,2 e 7,9)	75,0
3'	3,35 (<i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 8,8)	78,1
4'	3,27 (<i>m</i> , 1H)	71,8
5'	3,25 (<i>m</i> , 1H)	77,8
6'	3,86 (<i>dd</i> , 1Ha, <i>J</i> = 11,8 e 1,9) 3,6 (<i>dd</i> , 1Hb, <i>J</i> = 11,8 e 5,6)	62,7

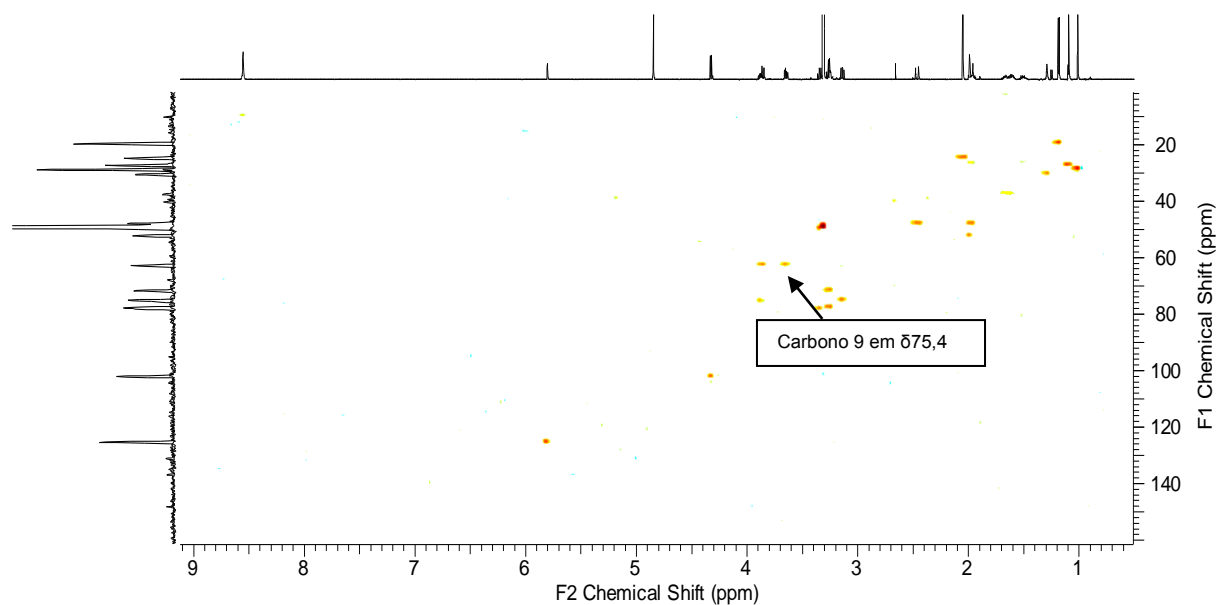
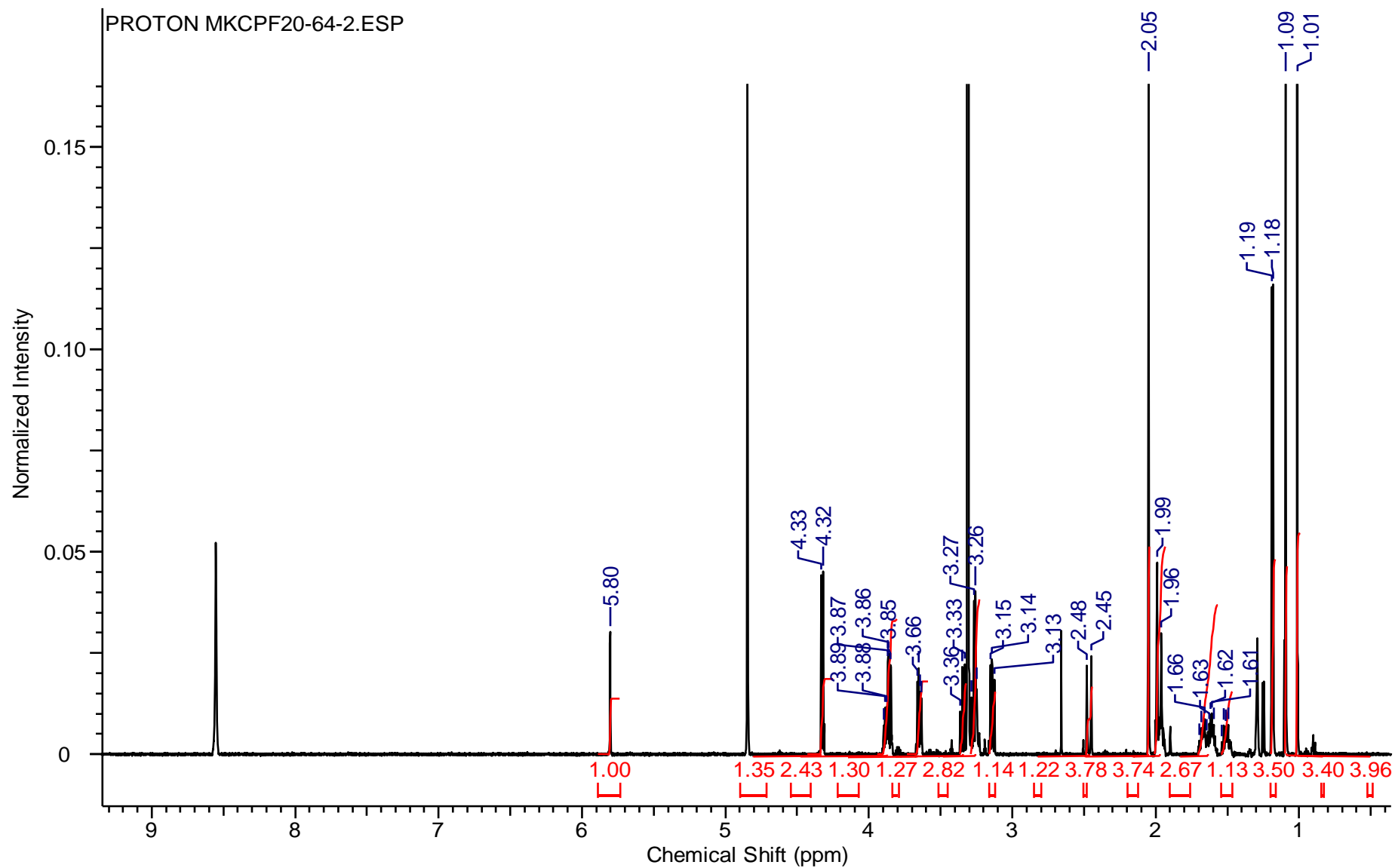


Figura 82 - Espectro HSQC de CPF-2

Figura 83 - Espectro RMN-¹H de CPF-2 em CD₃OD a 600 MHz e 25 °C

Por comparação com dados da literatura este composto foi identificado como (6*R*,9*S*) – blumenol C glucosídeo, o C9 epímero do byzantionosídeo (figura 84). Os dois compostos foram isolados pela primeira vez na espécie em estudo, sobre os quais não se há relatos de atividades biológicas.

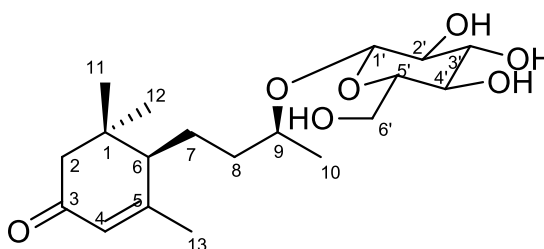


Figura 84 - Estrutura química do (6*R*,9*S*) – blumenol C glucosídeo

5.4.5.5 CP1-3

Este composto (0,5 mg) foi caracterizado também como um pó amorfo incolor. Seus espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C foram realizados em CD₃OD em 600 e 150,7 MHz (tabela 18).

O espectro de RMN-¹H apresentou quatro singletos correspondentes a quatro grupamentos metila, duas geminais δ 1,16 (H12), δ 1,38 (H11), uma em δ 1,47 (H13) e a última em δ 2,19 (H10), sendo esta provavelmente uma metila ligada a uma cetona em C9 à δ 200,3 (grupo metilcetona) (figura 86). Um hidrogênio oleofínico foi identificado em δ 5,89 (H8), e um hidrogênio anomérico em δ 4,52 (H1'). O glicosídeo foi identificado por comparação com a literatura como a glucopirranose (UMEHARA *et al.*, 1988). No espectro de RMN-¹³C não foi possível visualizar todos os carbonos, principalmente os quaternários (figura 85), devido a pouca quantidade de produto, mas estes foram visualizados no experimento HMBC (figura 89).

O hidrogênio em δ 5,89, ligado ao carbono em δ 101,5 (C8) possui um acoplamento com os carbonos δ 119,2 (C6) e δ 121,6 (C7), o que indica a presença de um grupamento alênico na parte aglicona da molécula, esta correlação foi evidenciada pelo experimento HMBC. Dois grupamentos CH_2 foram evidenciados em C2 e C4. A posição do glicosídeo foi definida pelos deslocamentos químicos dos carbonos carbinois C3 e C5, os quais foram comparados aos valores desses carbonos no composto sem glicosilação, a grasshopper cetona. Na cetona C3 está em δ 63,8 e C5 em δ 72,3, no composto analisado C3 encontra-se em δ 63,9 e C5 em δ 78,9, observando-se que C3 não se encontra deslocado em relação à cetona, já C5 está com 6,6 ppm de deslocamento, o que confirma a posição do glicosídeo neste carbono (MORI, 1974; OSORIO, DUQUE e FUJIMOTO, 1999).

Todas as correlações entre hidrogênios foram dadas pelos experimentos COSY e NOESY (figuras 85 e 90), e as correlações carbono-hidrogênio pelo HSQC e HMBC (figuras 88 e 89).

O espectro de massas de alta resolução revelou uma massa de m/z 409,1830 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculada 409,1838) correspondendo à fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{Na}^+$ (figura 91). Seu poder rotatório foi medido em $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -38,0^\circ$ (c 0,1 mg/100mL, MeOH), parecido com o encontrado na literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -95,7^\circ$ (UMEHARA *et al.*, 1988). Comparando-se os resultados experimentais com dados da literatura, a molécula foi identificada como citrosídeo, um megastigmano glicosilado (UMEHARA *et al.*, 1988; OSORIO, DUQUE e FUJIMOTO, 1999). Porém existem dois citrosídeos conhecidos o A e o B, os quais são epímeros na posição 8, portanto para saber qual citrosídeo corresponde esta molécula foi feito um espectro de RMN- ^1H utilizando-se piridina- d_6 e comparou-se o valor de H8 com a literatura. O resultado obtido revelou um valor de δ 6,01 para H8 (figura 92), o que confirmou que o composto corresponde ao citrosídeo A (figura 93) (UMEHARA *et al.*, 1988), também isolado pela primeira vez na espécie e sobre o qual não se tem muitos estudos de seu potencial biológico.

^aInterações fracas são indicadas em *itálico*

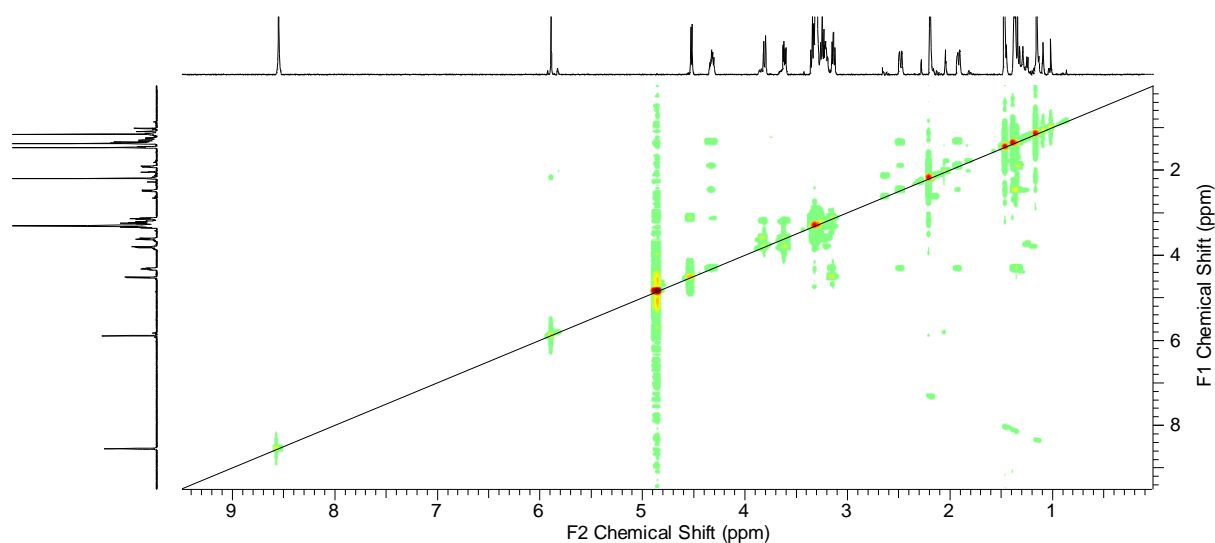


Figura 85 - Espectro COSY de CP1-3

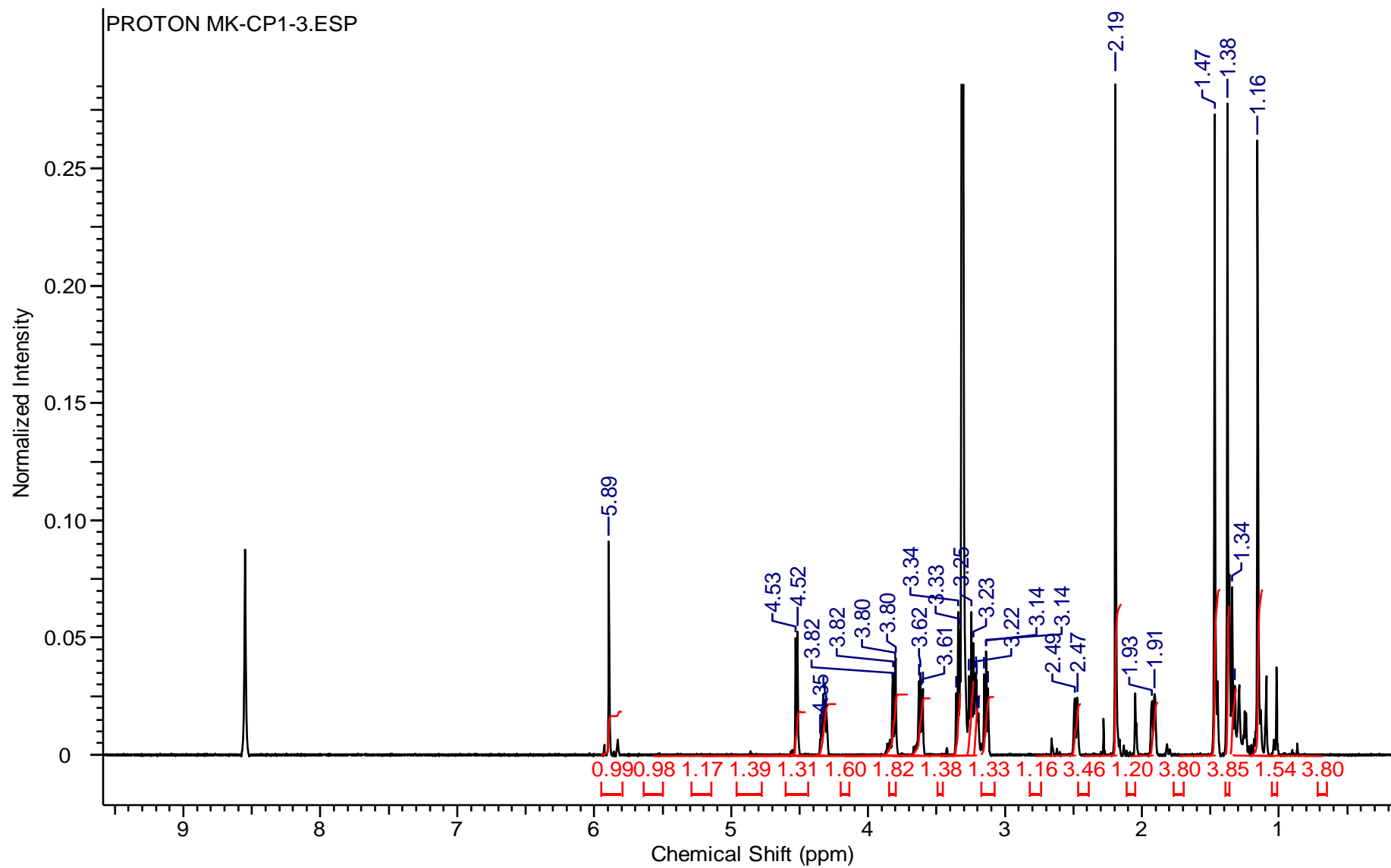


Figura 86- Espectro RMN- ^1H de CP1-3 em CD_3OD a 600 MHz e 25 $^\circ\text{C}$

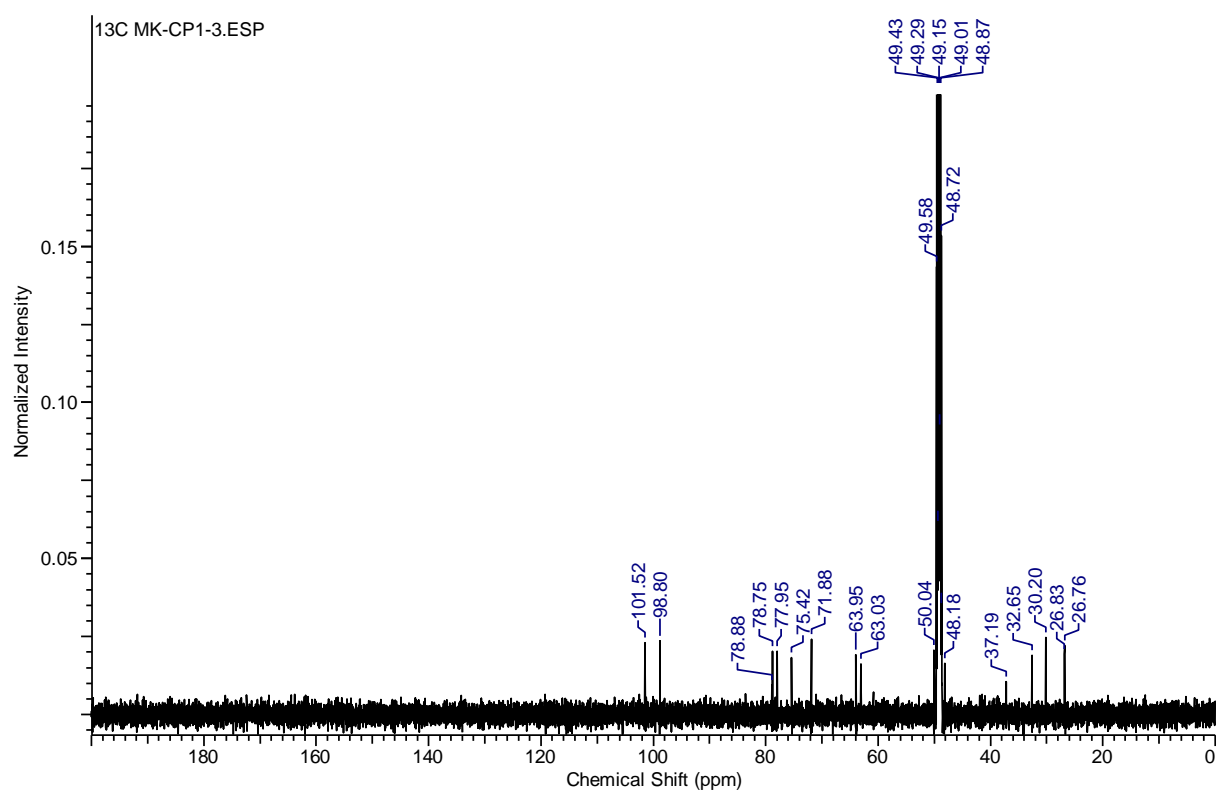


Figura 87 - Espectro RMN-¹³C de CP1-3 em CD₃OD a 150,7 MHz e 25 °C

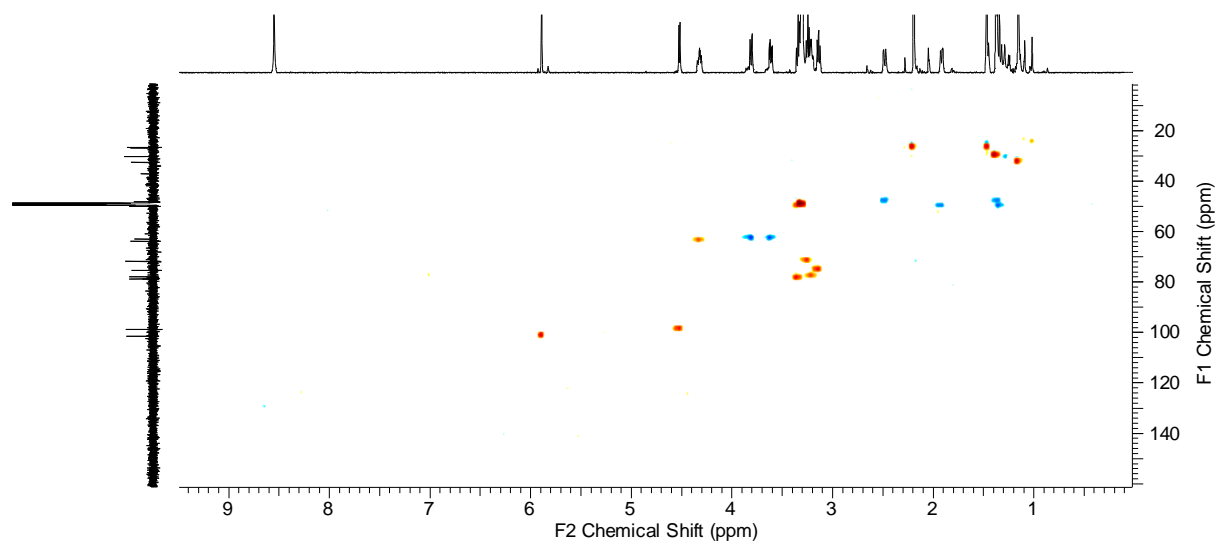


Figura 88 - Espectro HSQC de CP1-3

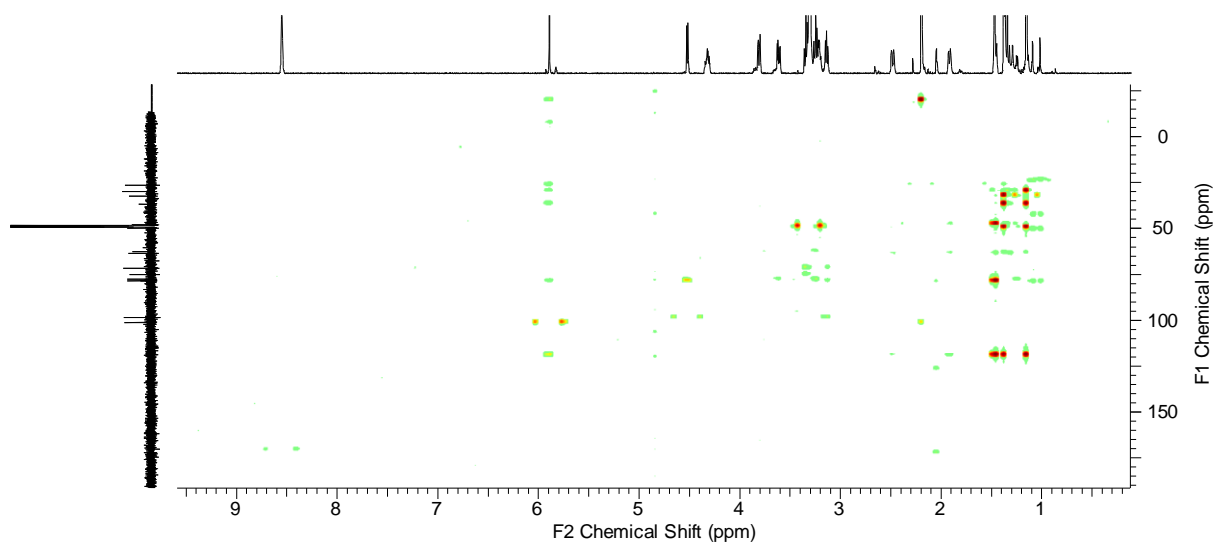


Figura 89 - Espectro HMBC de CP1-3

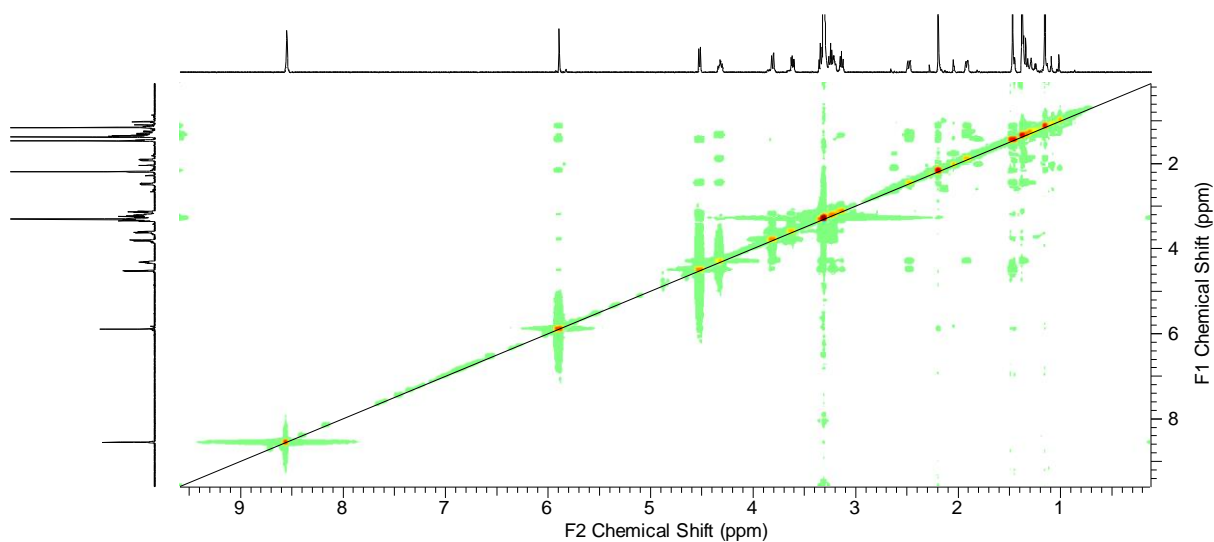


Figura 90 - Espectro NOESY de CP1-3

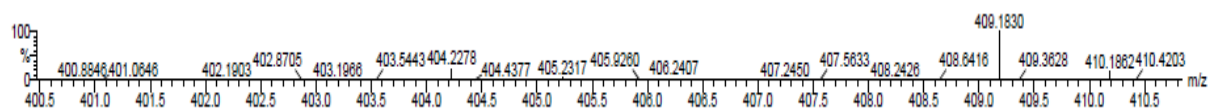


Figura 91 - Espectro de massa (ES+) de CP1-3

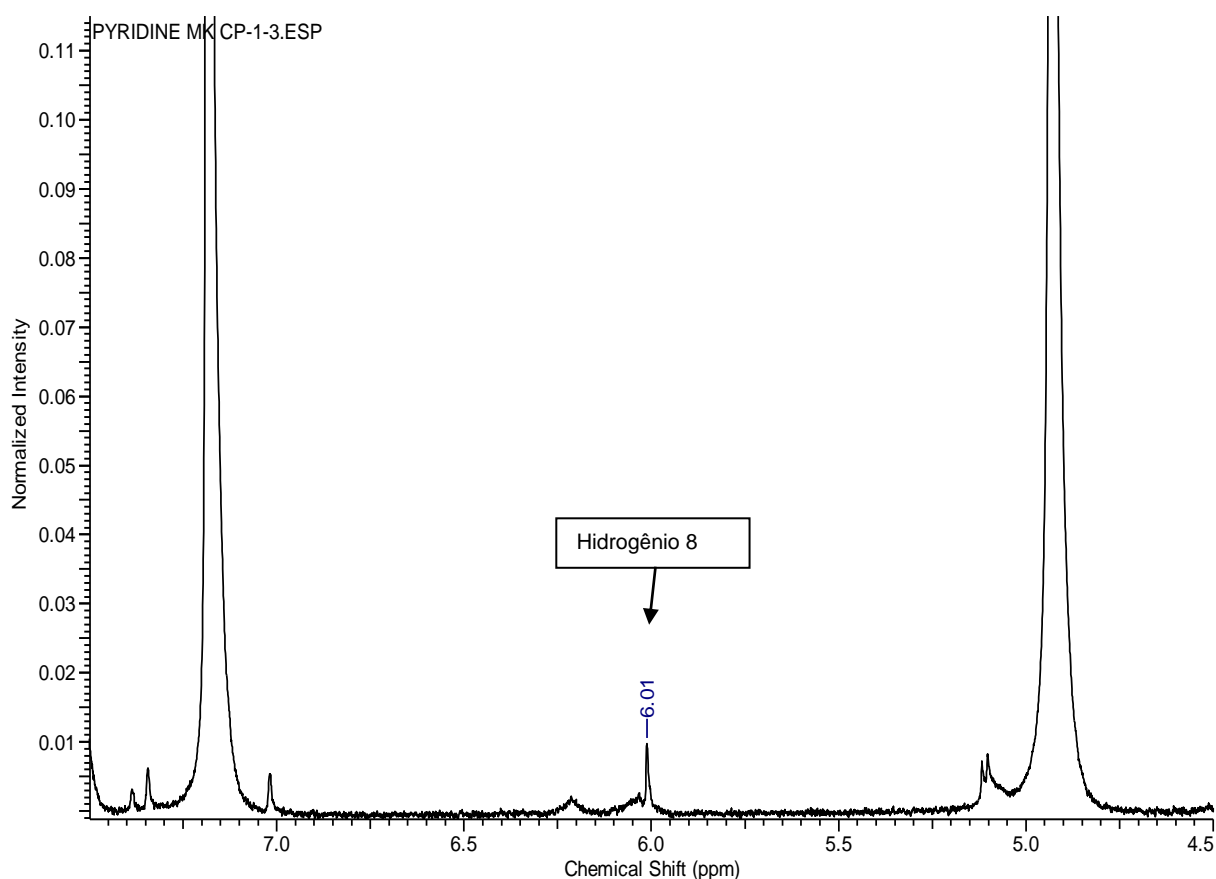


Figura 92 - Espectro RMN- ^1H na piridina- d_6 do composto CP1-3 à 500 MHz

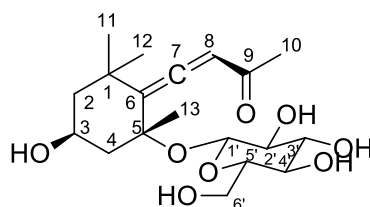


Figura 93 - Estrutura química do citrosideo A

5.5 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES

5.5.1 Desenvolvimento do Método

Para chegar ao método de doseamento vários gradientes de solventes foram testados. As primeiras tentativas foram feitas com metanol e fase ácida, no qual o gradiente de polaridade era feito com o metanol em um início de 5% até 100% deste solvente. Vários gradientes foram avaliados com este sistema de solventes, assim

como métodos isocráticos, porém devido a similaridade dos compostos não foi possível uma boa separação, por isso trocou-se o metanol por acetonitrila. Com este solvente também vários métodos foram testados, iniciando com quantidades mais elevadas de fase ácida com relação à acetonitrila, aumentando-se a polaridade com acetonitrila em diversos tempos, até chegar a melhor separação dos compostos. Com o método desenvolvido foram identificados a presença de 6 picos (figura 94). O maior pico, flavonoide hiperina, identificado previamente (KALEGARI *et al.*, 2011), foi identificado no cromatograma por co-injeção com o extrato, a qual está representada na figura 95. Devido a facilidade de isolar este composto e a grande quantidade obtida facilmente ele foi escolhido como marcador para validação do método.

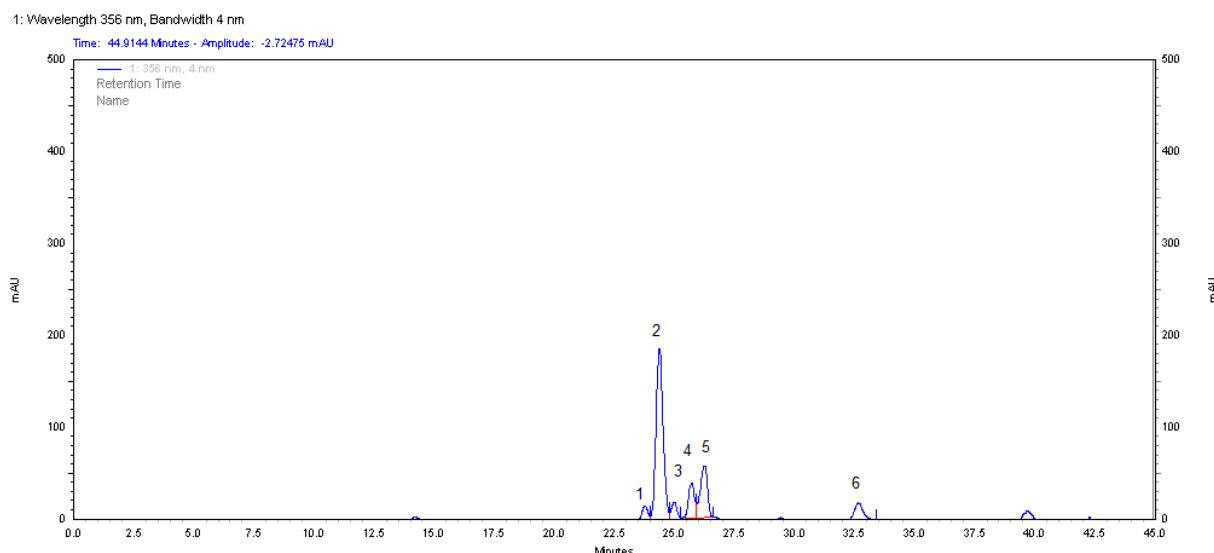


Figura 94 - Cromatograma de CLAE do extrato bruto etanólico de *Rourea induta*

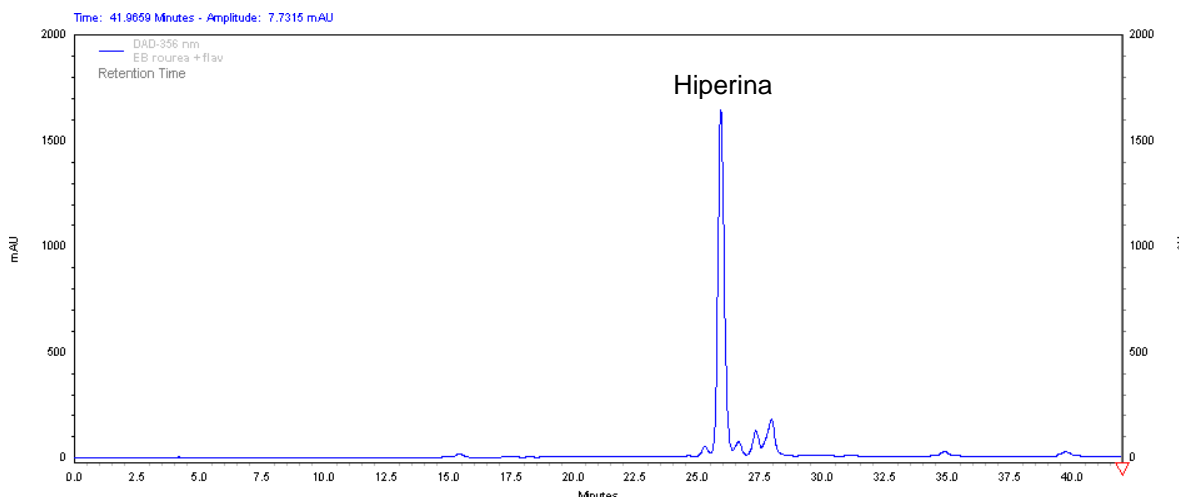


Figura 95 – Cromatograma de CLAE de co-injeção do extrato bruto etanólico e hiperina

Para quantificação dos compostos o método foi validado de acordo com a resolução 899/03 da ANVISA de validação de métodos analíticos em fitoterápicos, tendo como requisitos mínimos a especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez.

5.5.2 Linearidade

A linearidade consiste na capacidade de uma metodologia demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração de um analito na amostra. A linearidade do método foi obtida com o composto hiperina, em 5 concentrações: 0,08; 0,09; 0,1; 0,11 e 0,12 mg/mL, em triplicata. As concentrações de hiperina foram calculadas para cada solução e os resultados foram plotados em um gráfico para determinação do coeficiente de correlação (r^2), conforme figura 96.

Observando o gráfico tem-se uma reta passando pelo zero sem forçar, com correlação linear de $r^2 = 0,9964$, cumprindo assim a exigência da legislação de r^2 mínimo aceitável de 0,99, estabelecendo então a linearidade do método.

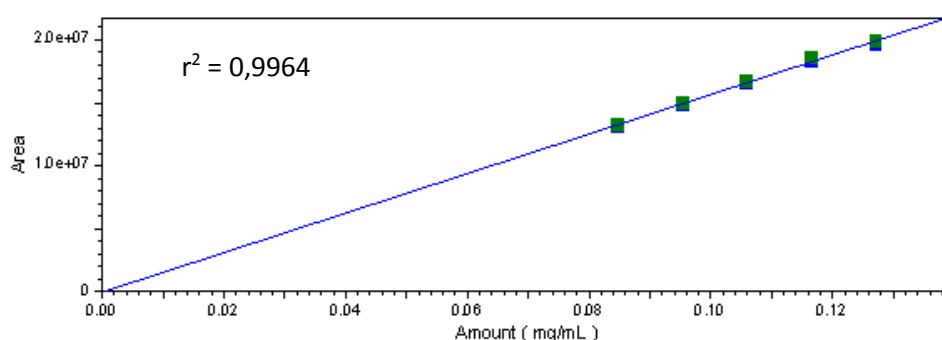


Figura 96 – Curva de calibração da hiperina para validação do método de quantificação de flavonoides em CLAE

5.5.3 Precisão

A precisão de um método avalia a proximidade dos resultados em uma série de medidas de uma mesma amostra. Esta precisão é avaliada como repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corridas). Para repetibilidade os resultados são obtidos num curto período de tempo em um mesmo laboratório por um mesmo analista, e para precisão intermediária a avaliação dos resultados é feita no mesmo laboratório, em dia diferente por outro analista. O coeficiente de variação entre as corridas não deve ser superior a 5%.

Para o método desenvolvido foram feitas seis corridas do extrato bruto etanólico (2 mg/mL) por um analista e seis corridas por outro analista em dias diferentes. Os resultados são apresentados na tabela 19.

Tabela 19 - Análise de precisão do método de doseamento em CLAE

Flavonoide	Repetibilidade Analista 1		Repetibilidade Analista 2		Precisão Intermediária	
	Concentração Média (mg/g)	CV (%)	Concentração Média (mg/g)	CV (%)	Concentração Média (mg/g)	CV (%)
Hiperina	48,00	0,90	47,39	0,75	47,69	1,04

Analisando os resultados obtidos não foi observada nenhuma variação acima de 5% entre as análises, tanto na repetibilidade como na precisão intermediária. A variação das concentrações se mostrou dentro do limite estabelecido pela legislação, o que confirma a precisão do método.

5.5.4 Robustez

A robustez de um método analítico mede a capacidade deste resistir a pequenas variações de parâmetros analíticos. Para avaliar esta capacidade foram escolhidas duas alterações: pH e fluxo da fase móvel. O pH normal da fase ácida utilizada é de 1,7, o qual foi aumentado para 2, e o fluxo normal é de 1 mL/min, o qual foi diminuído para 0,98 mL/min. Os resultados são apresentados na tabela 20.

Tabela 20 - Avaliação da robustez do método de quantificação dos flavonoides em CLAE

Flavonoide	Variação do pH (pH= 2)		Variação de fluxo (0,98 mL/min)	
	Concentração Média (mg/g)	CV (%)	Concentração Média (mg/g)	CV (%)
Hiperina	48,71	2,04	49,37	3,93

Analisando o coeficiente de variação das concentrações de hiperina pode-se observar que nenhuma foi maior do que 5%, valor recomendado pela RDC 899/2003, portanto o método se mostrou robusto.

5.5.5 Especificidade (Pureza)

A pureza dos picos foi determinada pelo detector acoplado de arranjo diodos (DAD), em 356 nm. A hiperina apresentou pureza de 100% estando de acordo com o exigido pela resolução, como pode ser observado na figura 97. Portanto o método pode ser considerado específico.

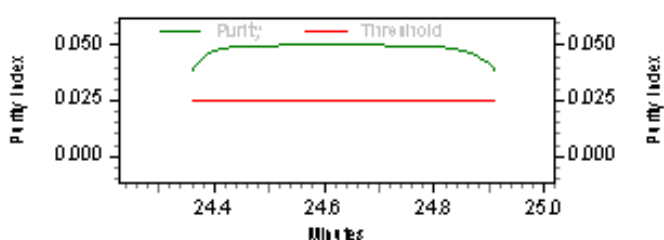


Figura 97 – Pureza do pico de hiperina analisado em CLAE para validação do método de quantificação de flavonoides

5.5.6 Quantificação do Extrato

Após a validação do método foram quantificados o extrato bruto etanólico final (2 mg/mL) (figura 98), e o extrato aquoso (2 mg/mL) (figura 99). Como os

demais picos possuem características comuns ao flavonoide hiperina eles foram quantificados também, as concentrações de cada um são apresentadas na tabela 21 e estão calculadas em relação à hiperina usada como padrão.

1: Wavelength 356 nm, Bandwidth 4 nm

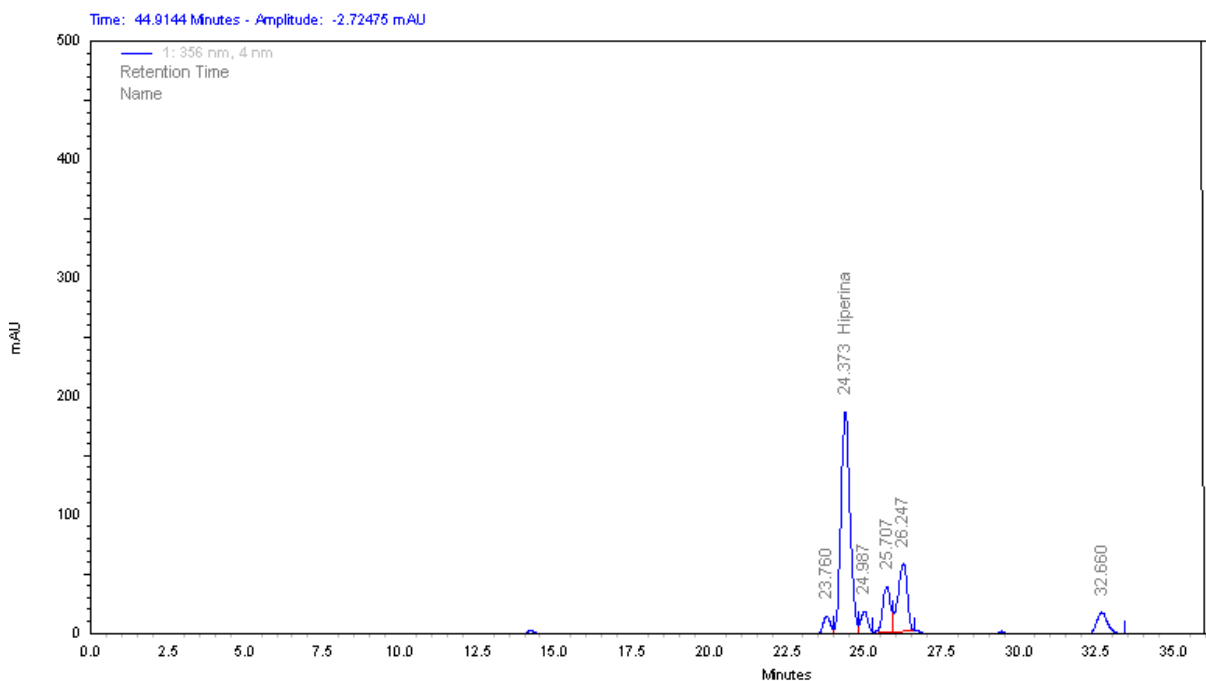


Figura 98 - Cromatograma de CLAE do extrato bruto etanólico de *Rourea induta* no método de quantificação de flavonoides

1: Wavelength 356 nm, Bandwidth 4 nm

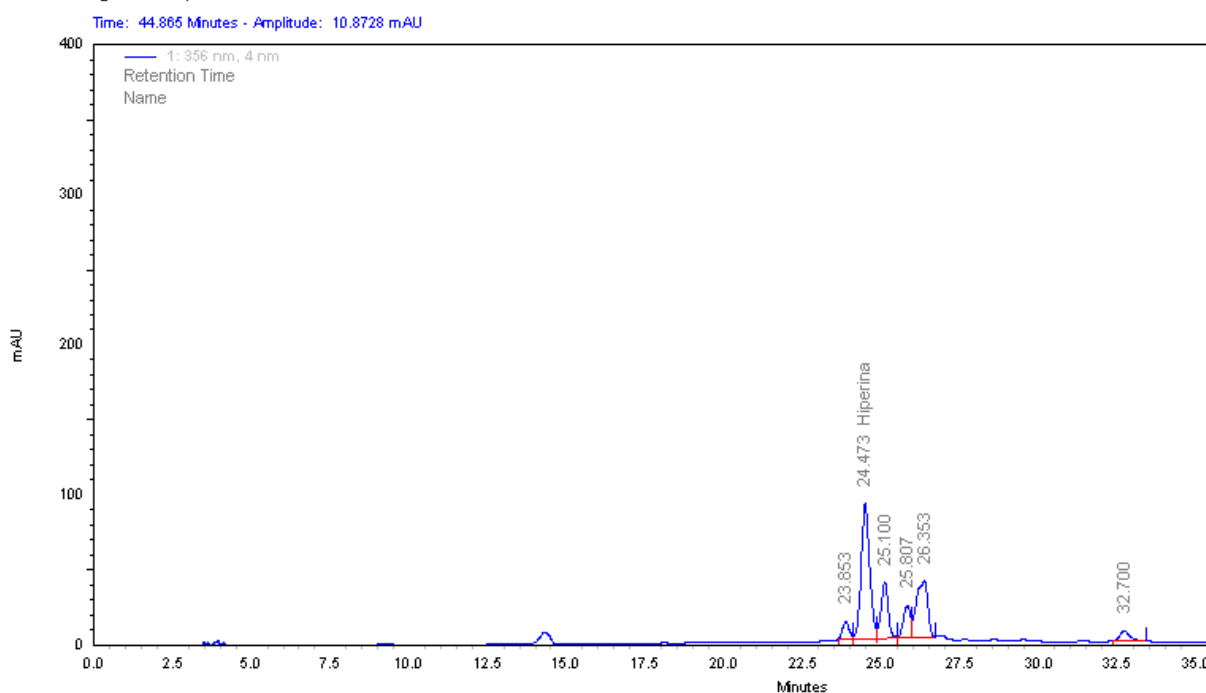


Figura 99 - Cromatograma de CLAE do extrato aquoso de *Rourea induta* no método de quantificação de flavonoides

Tabela 21 - Doseamento de flavonoides no extrato etanólico e extrato aquoso de *Rourea induta*

Flavonoide	Extrato bruto etanólico		Extrato aquoso	
	Concentração (mg/g)	Proporção (%)	Concentração (mg/g)	Proporção (%)
Pico 1	5,33	7,03	2,43	4,85
Hiperina	35,60	47,95	21,65	43,14
Pico 3	4,42	5,95	7,57	15,10
Pico 4	7,11	9,57	4,47	8,91
Pico 5	18,40	24,78	11,96	23,83
Pico 6	3,53	4,75	2,09	4,16
Total	74,24	-	50,18	

O extrato etanólico apresentou uma quantidade maior de flavonoides, 74,24 mg em 1 g de extrato, 32,41% a mais do que o extrato aquoso, para o qual obteve-se 50,18 mg de flavonoides para 1 g do extrato, sendo a hiperina majoritária nos dois extratos.

As frações clorofórmio, acetato de etila e residual provenientes do extrato etanólico também foram quantificadas, os resultados obtidos são apresentados na tabela 22.

Tabela 22 - Doseamento de flavonoides nas frações do extrato etanólico de *Rourea induta*

Flavonoide	Fração clorofórmio (mg/g)	Fração acetato de etila (mg/g)	Fração residual (mg/g)
Pico 1	1,83	6,25	2,09
Hiperina	38,93	114,87	6,00
Pico 3	1,14	10,76	1,95
Pico 4	13,67	28,89	0,35
Pico 5	47,94	44,79	-
Pico 6	16,9	18,04	-
Total	120,08	224,04	10,39

As frações clorofórmio e acetato de etila apresentaram uma concentração maior de flavonoides do que o extrato bruto. A fração acetato de etila tem uma concentração maior de flavonoides, na qual há a maior concentração de hiperina. Já a fração residual possui a menor concentração de flavonoides, pois a maioria dos

componentes foi extraída durante o fracionamento, ficando apenas resíduos nesta fração.

A utilização de um método analítico para quantificação de um marcador auxilia na padronização de um medicamento fitoterápico e pode ser utilizado nas análises de controle de qualidade. A validação do método é um dos requisitos do processo de registro para fitoterápicos exigidos pela Anvisa (RDC 14/2010), portanto o método desenvolvido pode ser utilizado para desenvolvimento de um possível medicamento com extrato de *R. induta*.

5.6 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

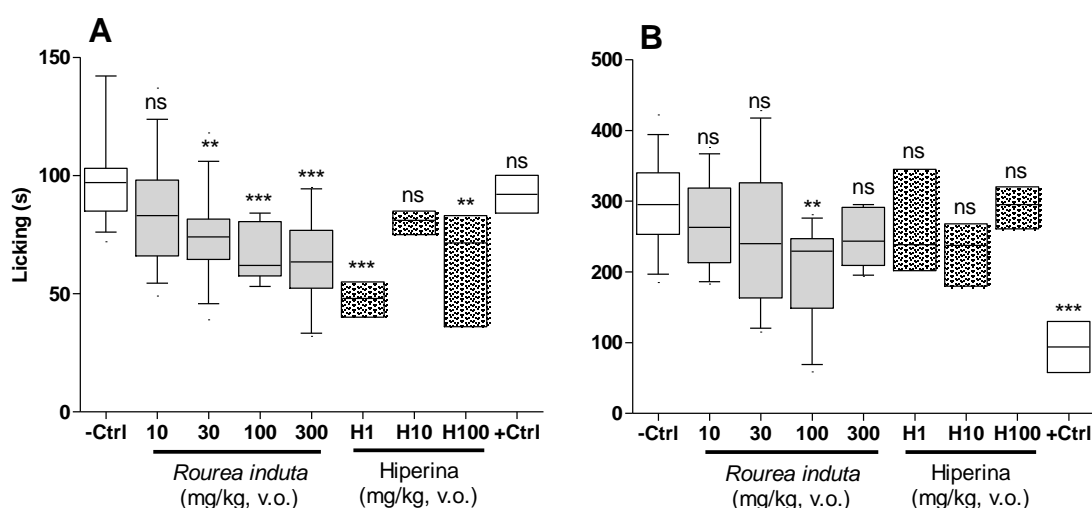
5.6.1 Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Formalina

O modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica, a qual envolve a estimulação direta dos nociceptores; e a de origem inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina e prostaglandinas, as quais estimulam os nociceptores provocando a dor (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992).

Para avaliação do extrato aquoso foi realizada uma curva com quatro doses (10, 30, 100 e 300 mg/kg v.o.). Na fase 1, referente a dor aguda, o extrato aquoso apresentou um perfil de inibição da nocicepção dose-dependente ($p < 0,01$) quando comparados ao controle salina com uma inibição máxima $I_{max} = 37 \pm 5\%$ (100 mg/kg) (gráfico 1A). Já na fase 2, fase que envolve a dor de origem inflamatória, apenas a dose de 100 mg/kg foi capaz de inibir a dor, com $I_{max} = 34 \pm 7\%$ (100 mg/kg), as demais doses não apresentaram inibição estatisticamente significativa ($p > 0,05$), como pode ser observado no gráfico 1B. Em contraste, o ácido acetil salicílico (400 mg/kg, v.o.) utilizado como controle positivo provocou inibição apenas na fase inflamatória do teste ($I_{max} = 66 \pm 7\%$), o que é característico de anti-inflamatórios não esteroidais. O flavonoide hiperina, composto marcador da espécie, também foi

testado para avaliar se ele é o responsável pela atividade do extrato. O composto puro foi testado nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg, v.o., o qual apresentou redução da nocicepção da primeira fase do teste, nas concentrações de 1 e 100 mg/kg, já na segunda fase não foi observado nenhum efeito (gráfico 1). Este resultado demonstra que a hiperina contribui para o efeito antinociceptivo do extrato, porém não é a única responsável.

Gráfico 1 – Efeito da administração aguda do extrato aquoso de *Rourea induta* (10 - 300 mg/kg, v.o.) e do composto hiperina (1-100 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida pela formalina em camundongos



A= fase 1; B= fase 2

Ctrl = controle salina, *** diferença estatística com o grupo controle negativo ($p < 0,001$), ** diferença estatística com o grupo controle negativo ($p < 0,01$), ns = não significativo.

Dessa maneira pode-se dizer que, a partir deste modelo, a espécie *R. induta* apresentou um significativo potencial antinociceptivo e anti-inflamatório, o que deve ser investigado. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados para espécies da mesma família, como *Byrsocarpus coccineus* e *Cnestis ferruginea* (AKINDELE e ADEYEMI, 2007b; ISHOLA, AKINDELE e ADEYEMI, 2011; ISHOLA *et al.*, 2012). De acordo com Chan, Tsai e Tian-Shang (1995); e Akbari, Mirzaei e Majd (2013) fármacos com ação central, como a morfina, inibem as duas fases nociceptivas do teste da formalina, e fármacos de ação periférica inibem somente a

segunda fase. A partir dos resultados obtidos, com inibição em ambas as fases, sugere-se o possível envolvimento do sistema opióide como mecanismo antinociceptivo (YERIMA *et al.*, 2009).

Esta atividade pode ser devida à composição polifenólica deste extrato, o qual possui flavonoides como compostos majoritários, compostos com atividade anti-inflamatória comprovada (AGNIHOTRI, WAKODE e AGNIHOTRI, 2010). Além dos flavonoides o extrato apresentou a presença de ácido clorogênico, substância que possui um potencial antioxidante tão grande quanto os flavonoides e que demonstrou possuir ação inibitória na segunda fase da formalina (SANTOS *et al.*, 2006). As proantocianidinas, também encontradas no extrato, possuem capacidade de inibir a cicloxigenase e lipoxigenase nas plaquetas e em macrófagos, o que pode contribuir para a atividade deste extrato (FINE, 2000).

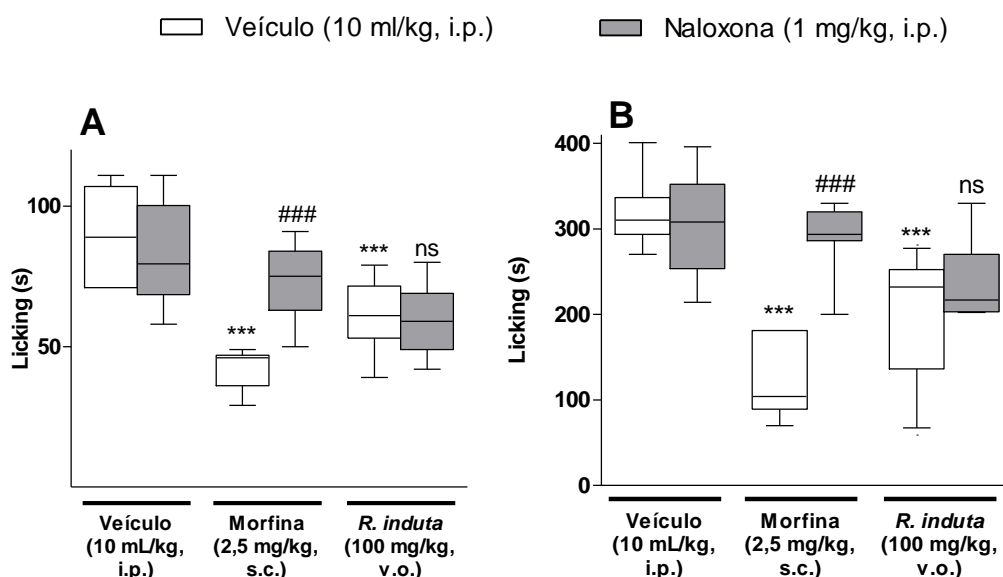
5.6.2 Avaliação do Envolvimento do Sistema Opióide

O sistema opióide é um dos principais mecanismos de ação analgésica, através dele há alteração do transporte de cálcio nas membranas e inibição da liberação de neurotransmissores (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998). O envolvimento deste sistema como mecanismo responsável pela ação antinociceptiva apresentada pelo extrato aquoso de *R. induta* foi avaliando observando-se a capacidade de reversão do efeito antinociceptivo do extrato pela naloxona, antagonista opióide não seletivo, uma vez que o extrato apresentou inibição das duas fases do teste da formalina. A reversão do efeito pode indicar atuação central (OLSON *et al.*, 2014).

O pré-tratamento com naloxona reverte significativamente a ação da morfina, fármaco agonista opióide utilizada como referência, ou seja, atua nos receptores impedindo que a morfina se ligue a eles, impedindo consequentemente sua ação. Observando o gráfico 2 verifica-se que o pré-tratamento com naloxona não foi capaz de reverter a ação do extrato aquoso em nenhuma das fases do teste da formalina, indicando que a ativação dos receptores opióides não está envolvida na ação antinociceptiva do extrato. Portanto, outras vias de analgesia podem estar

envolvidas, como sistema adrenérgico, via do ácido araquidônico ou via da ciclooxigenase, o que ainda deve ser investigado.

Gráfico 2 - Avaliação do envolvimento do sistema opióide como mecanismo de ação antinociceptiva do extrato aquoso de *Rourea induta* (100 mg/kg, v.o.) no teste de nocicepção induzida pela formalina



A= Fase 1; B= Fase 2

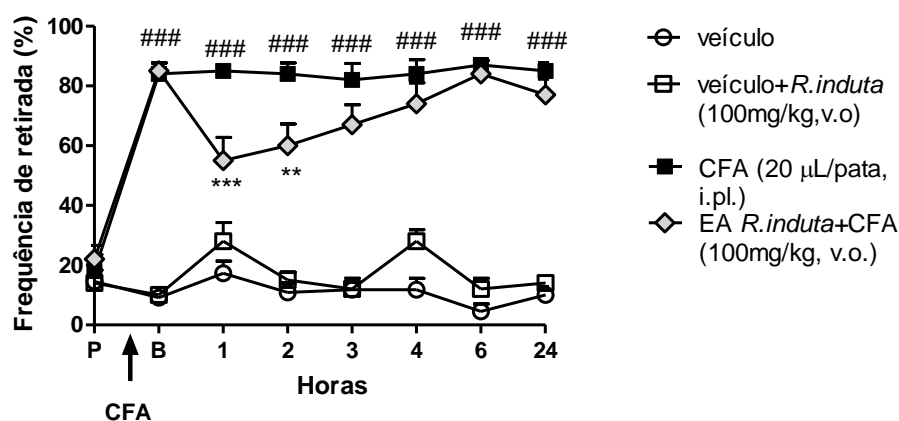
*** diferença estatística com o grupo controle salina ($p < 0,001$) ### diferença estatística dos grupos tratados com naloxona e os grupos tratados com veículo + morfina ou extrato ($p < 0,01$), ns = não significativo.

5.6.3 Modelo de Dor Inflamatória Crônica Induzida pelo Adjuvante Completo de Freund

Para melhor investigar o potencial antinociceptivo do extrato aquoso em estudo foi realizado um teste para avaliar a dor crônica de origem inflamatória, a qual foi provocada pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA) e avaliada pela presença ou não de hipersensibilidade ao estímulo da dor por um filamento Von Frey de 0,4 g, estímulo que em condições normais não causa dor. A injeção periférica de CFA causa uma dor crônica que leva a liberação de diversos mediadores inflamatórios e nociceptivos causando um aumento da sensibilidade periférica e central das vias nociceptivas (BASBAUM, 1999). Neste caso, um aumento do glutamato e de citocinas como IL-1 β e TNF- α no corno dorsal da medula espinhal contribui para essa sensibilização, o que está envolvido com a transmissão e a manutenção da dor crônica (JI e WOOLF, 2001; SOMMER e KRESS, 2004).

No estudo com o extrato aquoso de *R. induta* foi realizado um curso temporal da ação do extrato (*time course*), no primeiro dia do teste, para verificar o perfil de inibição da hipersensibilidade. Em uma administração aguda do extrato aquoso (100mg/kg, v.o.) este apresentou uma diminuição da hipersensibilidade mecânica nas duas primeiras horas após o tratamento, voltando a níveis não significativos após 3 horas de tratamento. Observando o gráfico construído para o *time course* (gráfico 3) percebe-se que a máxima inibição ocorreu 1h após o tratamento, $61 \pm 10\%$.

Gráfico 3 – Efeito da administração aguda do extrato aquoso de *Rourea induta* (100 mg/kg, v.o.) na hipersensibilidade mecânica induzida pelo CFA

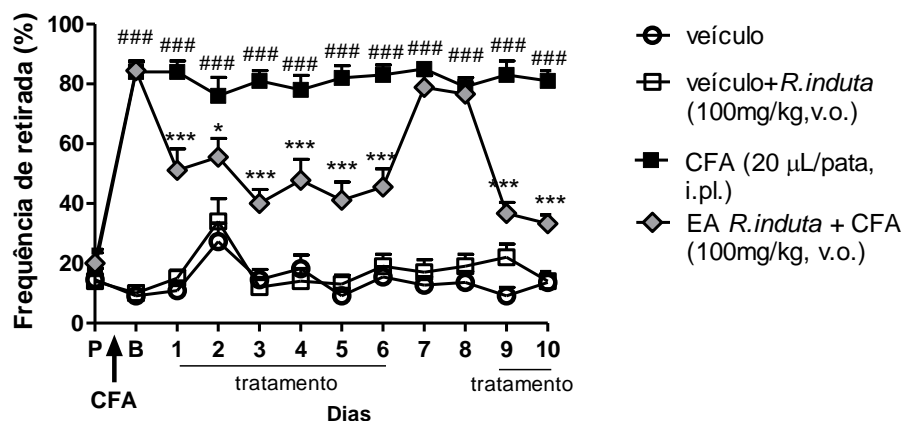


EA = extrato aquoso

*** diferença estatística com o grupo controle CFA ($p < 0,001$), ** diferença estatística com o grupo controle CFA ($p < 0,01$), ### diferença estatística com o grupo controle salina ($p < 0,001$)

Durante o período de avaliação (10 dias) os animais foram tratados com extrato aquoso (100 mg/kg, v.o.) e avaliados duas horas depois, sendo os resultados da avaliação crônica apresentados no gráfico 4. Percebe-se que o extrato possui um efeito anti-hipersensibilizante na dor de origem crônica, efeito observado a partir do primeiro dia de tratamento persistindo até o último, onde a frequência de retirada da pata ao estímulo da dor foi menor nos animais tratados quando comparados aos animais que não receberam o tratamento com extrato (grupo controle CFA), concluindo assim que houve inibição da nocicepção desses animais (gráfico 4). Conclui-se também que o extrato sozinho não apresenta nenhuma influência sobre a nocicepção, uma vez que os animais que não receberam o CFA e foram tratados com o extrato (100 mg/kg v.o.) tiveram o mesmo comportamento do grupo que recebeu apenas solução salina, excluindo-se qualquer efeito adicional do mesmo.

Gráfico 4 – Efeito da administração crônica do extrato aquoso de *Rourea induta* (100 mg/kg, v.o.) por 10 dias na hipersensibilidade mecânica induzida pelo CFA

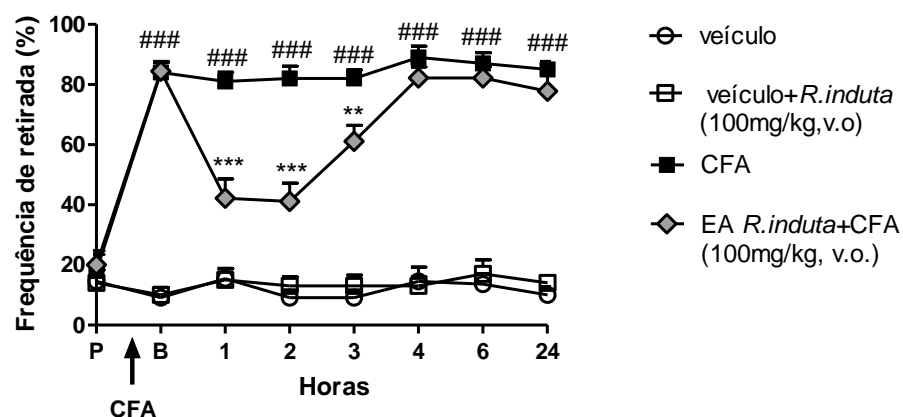


EA = extrato aquoso

*** diferença estatística com o grupo controle CFA ($p < 0,001$), ** diferença estatística com o grupo controle CFA ($p < 0,01$), ### diferença estatística com o grupo controle salina ($p < 0,001$)

No início da avaliação suspeitou-se de que havia um efeito cumulativo do extrato, pois a inibição foi um pouco maior nos dias subsequentes à primeira administração do extrato, para tanto no quinto dia foi realizado um novo *time course* para verificar o perfil de inibição (gráfico 5), porém percebeu-se que o perfil apresentado foi semelhante ao primeiro dia de teste, após 4 h os animais voltaram a responder ao estímulo.

Gráfico 5 – Curso temporal do extrato aquoso de *Rourea induta* (100 mg/kg, v.o.) no 5º dia de tratamento na hipersensibilidade mecânica induzida pelo CFA



EA = extrato aquoso

*** diferença estatística com o grupo controle CFA ($p < 0,001$), ** diferença estatística com o grupo controle CFA ($p < 0,01$), ### diferença estatística com o grupo controle salina ($p < 0,001$)

No sétimo e oitavo dias os animais não foram tratados com extrato para observar se havia algum efeito tardio do mesmo, no entanto os animais responderam normalmente ao estímulo da dor, o efeito redutor da hipersensibilidade de *R. induta* não foi observado, confirmando que o extrato após 24 horas de tratamento não apresenta mais nenhum efeito. Após esses dois dias os grupos voltaram a receber o tratamento e houve novamente a inibição ao estímulo, ou seja, a mesma resposta foi observada.

A dor persistente causada pela injeção de CFA é bem conhecida, ela envolve uma sensibilização central devida à presença de vários mediadores inflamatórios e nociceptivos, o que leva a um aumento na sensibilidade periférica no local da injúria (LUCENA, *et al.*, 2007). Sabendo disso e analisando os resultados obtidos com o extrato aquoso de *R. induta* conclui-se que a administração aguda e prolongada do mesmo apresenta um efeito significativo de inibição da nocicepção em modelo de dor de origem inflamatória crônica causada pelo CFA em camundongos, um efeito que dura até 2 horas e não apresenta tolerância.

Este efeito pode estar relacionado à composição química do extrato, que é rico em flavonoides, uma vez que se têm dados que comprovam a ação anti-inflamatória de vários deles, entre eles quercetina e hiperina, os quais podem bloquear a ciclooxigenase e lipoxigenase que fazem parte do metabolismo do ácido araquidônico, ou ainda bloquear a liberação de histamina e outras substâncias inflamatórias; bem como o ácido clorogênico que possui ação anti-inflamatória e antinociceptiva (SANTOS *et al.*, 2006; AGNIHOTRI, WAKODE e AGNIHOTRI, 2010) e as proantocianidinas que também inibem COX e lipoxigenase (FINE, 2000).

Para verificar se este efeito redutor da hipersensibilidade é realmente devido a um efeito anti-inflamatório, no último dia de avaliação, os animais foram eutanasiados e foram retiradas as peles das patas inflamadas e a porção lombar da medula espinhal, para observar se o extrato teve capacidade de diminuir a concentração de citocinas inflamatórias para o local inflamado e assim diminuir a nocicepção.

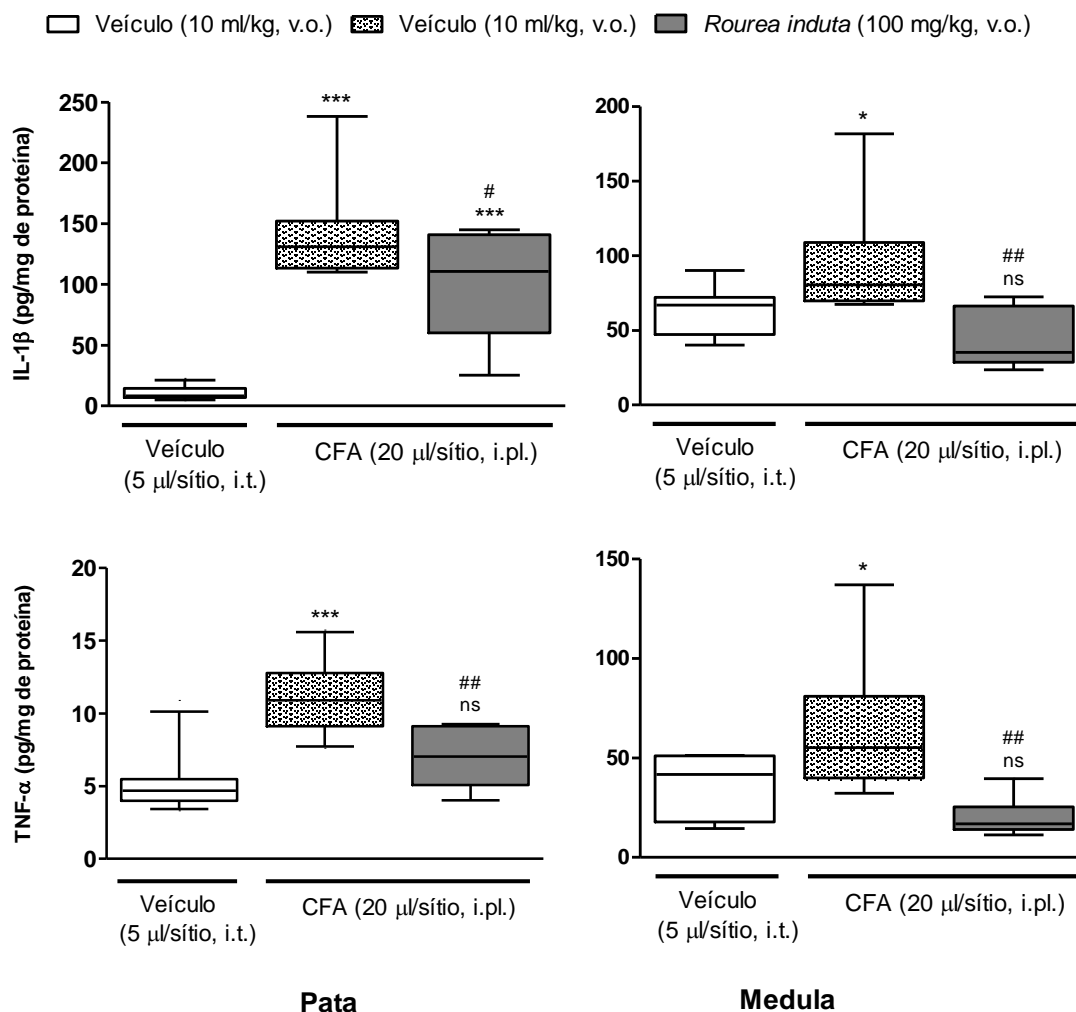
5.6.3.1 Quantificação de citocinas

A administração de CFA leva a um aumento da concentração de citocinas inflamatórias no local inflamado (pata) e na medula espinhal, onde há sensibilização de nociceptores ativando vias periféricas e centrais. Dentre as citocinas têm-se o TNF- α e IL-1 β , sendo o TNF- α uma citocina capaz de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas que pode ser liberado por diversas células. Essas duas citocinas, assim como outras, induzem uma série de respostas no organismo, como febre, redução da ingestão de água, aumento da liberação de corticosteróides, hiperalgesia, entre outros, o que acontece na tentativa de combater o patógeno (KRAYCHETE, CALASANS e VALENTE, 2006). O TNF- α é um dos responsáveis pela dor induzida pela formalina, uma vez que anticorpos anti-TNF- α reduziram significativamente o número de lambidas e mordidas dos animais na dor inflamatória (SANTOS *et al.*, 2006).

Como pode ser observado nos gráficos a seguir, o CFA foi capaz de aumentar as concentrações de TNF- α e IL-1 β na pata bem como na medula. Percebe-se que o extrato aquoso administrado uma vez ao dia por 10 dias (100 mg/kg, v.o.) foi capaz de prevenir esse aumento, pois houve uma diminuição nas concentrações dessas citocinas na pata (50 \pm 19% de inibição da produção de TNF- α e 22 \pm 12% de IL-1 β) e medula (100% de inibição para ambas) quando comparadas ao grupo CFA (gráfico 6).

A inibição de citocinas inflamatórias serve como um mecanismo chave no controle da inflamação, pois esta supressão tem um potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias (WEN *et al.*, 2011). Portanto esses resultados indicam uma atividade anti-inflamatória do extrato pela diminuição da produção ou liberação das citocinas, o que pode estar relacionado à ação antinociceptiva encontrada no teste do CFA e formalina, uma vez que elas estimulam resposta nociceptiva quando se ligam a seus nociceptores (SANTOS, *et al.* 2006).

Gráfico 6 - Efeito da administração crônica por 10 dias do extrato aquoso de *Rourea induta* (100 mg/kg, v.o.) na quantidade de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo CFA na pata e medula espinhal de camundongos



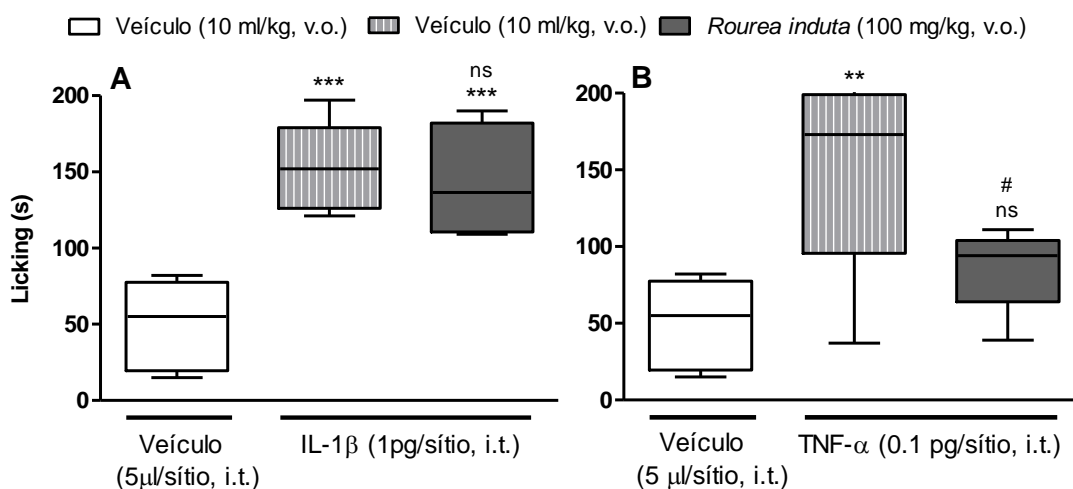
*** diferença estatística com o grupo controle salina ($p < 0,001$), * diferença estatística com o grupo controle salina ($p < 0,05$), ## diferença estatística com o grupo controle CFA + veículo ($p < 0,01$), # diferença estatística com o grupo controle CFA + veículo ($p < 0,05$), ns = não significativo.

5.6.4 Dor Induzida por Citocinas

As citocinas TNF- α e IL-1 β são liberadas nos processos inflamatórios que estimulam os nociceptores aumentando a nocicepção no local, portanto uma injeção intratecal das mesmas em camundongos provoca nocicepção no ventre e dorso dos animais, como pode ser observado no gráfico 7. A administração oral aguda do extrato aquoso de *R. induta* (100 mg/kg; v.o.) provocou uma diminuição da dor provocada pelo TNF- α ($81 \pm 11\%$ de inibição) mas não da dor provocada pela IL-1 β quando comparadas ao grupo controle (gráfico 7). Este resultado indica, mais uma

vez, que o efeito antinociceptivo do extrato aquoso está relacionado com o TNF- α , uma das principais citocinas inflamatórias para o desenvolvimento da resposta imune (LONGHI-BALBINOTI *et al.*, 2012). Além de diminuir a dor provocada por ela o extrato aquoso também diminuiu sua produção/liberação no local da inflamação, resultado verificado no teste da dor inflamatória crônica causada pelo CFA.

Gráfico 7 - Efeito da administração aguda do extrato aquoso de *Rourea induta* (100 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por TNF- α e IL-1 β em camundongos



A= nocicepção induzida pela IL-1 β , B= nocicepção induzida pelo TNF- α

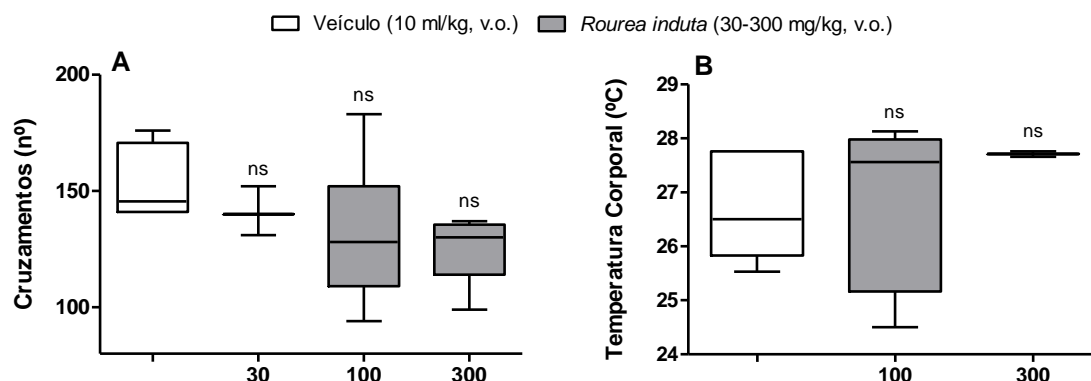
*** diferença estatística com o grupo controle salina ($p < 0,001$), ** diferença estatística com o grupo controle salina ($p < 0,01$),

diferença estatística com o grupo citocina + veículo ($p < 0,05$), ns = não significativo.

5.6.5 Teste do Campo Aberto e Temperatura Corporal

O teste de campo aberto é usado para excluir a possibilidade de que a ação antinociceptiva do extrato esteja relacionada com efeitos inespecíficos, tanto em nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais. Após administração de três doses (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) não foi detectada nenhuma alteração locomotora dos animais, todos os grupos se mostraram ativos como o controle salina, excluindo a possibilidade de efeito inespecífico locomotor do extrato (gráfico 8A).

Gráfico 8 - Efeitos não específicos da administração aguda em camundongos do extrato aquoso de *Rourea induta* em diferentes doses



A = efeito sobre a atividade locomotora, B = efeito na temperatura corporal
ns = não significativo

Para se excluir outra possibilidade de efeito inespecífico a temperatura corporal dos animais foi medida antes e depois da administração do extrato nas maiores doses, através da qual se verificou que não houve alteração após o tratamento, descartando mais um efeito inespecífico do extrato (gráfico 8B). Uma diminuição ou aumento da temperatura corporal nos animais pode mascarar o verdadeiro efeito do extrato.

5.6.6 Determinação da Capacidade Antioxidante *in vivo*

5.6.6.1 Parâmetros bioquímicos

O modelo de hepatotoxicidade induzida por CCl_4 é muito utilizado pois os danos hepáticos causados por ele são considerados análogos aos danos encontrados em hepatites humanas (CHOI *et al.*, 2011), o que leva a um aumento dos níveis das enzimas marcadoras de lesão hepática, ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase), e bilirrubina total (produto de degradação do grupo heme das hemácias). Este efeito é causado pelo seu metabólito ativo, o radical peroxitriclorometil, que se liga covalentemente às macromoléculas e induz a degradação dos lipídios de membrana, levando a

formação de peróxidos de lipídios e degeneração da membrana dos hepatócitos (PALANIVEL *et al.*, 2008).

O extrato etanólico de *R. induta* na dose diária de 500 mg/kg (v.o.) por 7 dias evitou o aumento dos níveis de ALT, AST e bilirrubina total ($p < 0,001$) após o a administração de CCl_4 (tabela 23). Os níveis encontrados nos animais tratados com extrato foram comparáveis aos níveis dos animais que foram tratados com o medicamento padrão Legalon®, ou seja, o extrato foi capaz de prevenir o dano causado pelo CCl_4 . O efeito hepatoprotetor do extrato e do Legalon® é evidenciado ainda pela diminuição do peso dos fígados dos animais pré-tratados com CCl_4 , o qual normalmente é aumentado por este agente, a redução no peso chegou à níveis normais do controle, como pode ser observado na tabela 23.

Tabela 23 - Efeito do extrato etanólico de *Rourea induta* nos níveis de aminotransferases e bilirrubina total

Tratamento	Peso relativo do fígado (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BIL (mg/dL)
Normal	3,46 \pm 0,18	49,60 \pm 29,30	136,60 \pm 48,16	1,24 \pm 0,23
CCl_4	4,49 \pm 0,41 ^a	388,80 \pm 52,46 ^a	750,80 \pm 219,20 ^a	2,60 \pm 0,58 ^a
CCl_4 + <i>R. induta</i>	3,17 \pm 0,41	52,20 \pm 12,72	118,20 \pm 23,35	1,26 \pm 0,26
CCl_4 + Legalon®	3,28 \pm 0,64	54,40 \pm 29,66	122,00 \pm 47,34	1,24 \pm 0,15

Valores expresso em média \pm S.D

^aValores que diferem significativamente do grupo controle ($p < 0,001$)

5.6.6.2 Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo

As enzimas SOD, CAT e GPx são enzimas que fazem parte do sistema de defesa antioxidante do organismo. A ação coordenada dessas enzimas é essencial para a detoxificação das EROs e sua conversão novamente em moléculas estáveis, as quais não provocam danos celulares. O primeiro passo deste processo é a dismutação dos radicais de oxigênio ($\text{O}_2^{\cdot-}$), em peróxidos de hidrogênio, o que é feito pela SOD e seguido pela catalase e glutathione peroxidase (GPx), as quais trabalham juntas para reduzir H_2O_2 produzindo água e oxigênio. A GPx é a primeira linha de defesa contra os efeitos deletérios de H_2O_2 no organismo, porém em grandes quantidades de H_2O_2 ela é insuficiente para catalisar a degradação total desta molécula, o que leva a ativação da CAT (GAETANI *et al.*, 1989; AKINDELE *et al.*,

2010). A diminuição da atividade da SOD indica dano hepático, e a diminuição da atividade da CAT pode levar a uma série de efeitos deletérios devido a assimilação do radical superóxido e peróxido de hidrogênio (PALANIVEL *et al.*, 2008).

O tratamento com CCl₄ leva a uma significativa diminuição da atividade dessas enzimas, como pode ser observado na tabela 24. O tratamento com extrato etanólico de *R. induta* (500 mg/kg, v.o., 7 dias) foi capaz de reverter as atividades de todas essas enzimas à níveis normais após a diminuição pelo CCl₄ (tabela 24), o que corrobora com os resultados anteriores de que este extrato é capaz de atenuar injúrias hepáticas em animais tratados com CCl₄. Percebe-se que nos animais tratados com extrato houve um aumento considerável dos níveis de SOD e CAT, valores comparáveis aos animais do grupo Legalon[®].

O aumento da atividade das enzimas antioxidantes pode indicar aumento na transcrição de CAT, o que pode desempenhar um importante papel na proteção hepática desencadeada pelo extrato. Estudos recentes mostraram que polifenóis, como hiperina e rutenona, induzem significativamente a expressão gênica de SOD, CAT e GPx (SÁNCHEZ-REUS *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2011), e outros estudos tem indicado que um sinergismo entre polifenóis em extratos apresentam diversos efeitos fisiológicos, entre eles ação antioxidante (SOORY, 2009).

O dano hepático causado pelo CCl₄ nas membranas celulares está associado ao aumento da lipoperoxidação, o que é evidenciada pelo aumento dos níveis de SRAT (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). A administração diária do extrato etanólico de *R. induta* foi capaz de inibir a peroxidação lipídica no fígado, reduzindo assim os danos causados. O extrato se mostrou tão efetivo quanto o Legalon[®] (tabela 24). Os níveis de GSH também são indicadores da peroxidação lipídica relacionada à função hepática, fornecendo informações quanto ao balanço oxidante/antioxidante no organismo. No tratamento com extrato etanólico os níveis de GSH aumentaram em níveis superiores aos animais controle, indicando prevenção dos efeitos na peroxidação lipídica causada pelo CCl₄.

O efeito hepatoprotetor do extrato sugere que os flavonoides e demais polifenóis identificados na espécie possuem um papel importante na estabilização das membranas plasmáticas e na reparação dos danos hepáticos. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que descrevem as atividades antioxidante e hepatoprotetora de extratos com conteúdo polifenólico. A quercetina provocou um aumento nos níveis de SOD, catalase e glutathione em ratos (BEHLING, 2004), e a

hiperina, flavonoide em maior quantidade no extrato de *R. induta*, foi descrita como antioxidante *in vivo* por Choi *et al.* (2011), atividade também descrita para a espécie *Byrsocarpus coccineus* por Akindele *et al.* (2010). Portanto pode-se dizer que a espécie em estudo possui efeitos benéficos melhorando a função hepática e inibindo a formação de radicais livres, podendo ser útil em casos de intoxicação hepática.

Tabela 24 – Efeito do extrato etanólico das folhas de *Rourea induta* nos marcadores de estresse oxidativo (CAT, GPx, SOD e GSH)

Tratamento	CAT (U/mg proteína)	SOD (U/mg proteína)	GPx (U/mg proteína)	GSH (mmol/L)	SRAT (μmol/L)
Normal	49,70 ± 14,78	49,79±7,35	9,01±1,80	5,09±0,50	28,15±7,26
CCl ₄	15,42 ± 1,99 ^a	19,99±3,73 ^a	3,08±0,64 ^a	3,09±0,39 ^a	73,16±9,37 ^a
CCl ₄ + <i>R. induta</i>	60,28 ± 19,79 ^c	35,92±12,79 ^{a,e}	5,48±1,55 ^{b,e}	7,11±0,69 ^{a,c}	27,80±8,43 ^c
CCl ₄ + Legalon®	38,97 ± 2,94 ^d	45,87±13,87 ^c	10,15±2,67 ^c	5,83±0,43 ^{b,c}	33,09±5,45 ^c

Valores expressos como média ±S.D.

^a Valores que diferem significativamente do grupo controle ($p<0,001$)

^b Valores que diferem significativamente do grupo controle ($p<0,01$)

^c Valores que diferem significativamente do grupo CCl₄ ($p<0,001$)

^d Valores que diferem significativamente do grupo CCl₄ ($p<0,01$)

^e Valores que diferem significativamente do grupo CCl₄ ($p<0,05$)

5.6.6.3 Avaliação histopatológica do fígado

O dano hepático causado por CCl₄ foi confirmado pela análise histopatológica, a qual revelou alterações celulares compatíveis com dano hepático, como esteatose microvesicular, hepatócitos balonizados, infiltração de neutrófilos e necrose no fígado após administração de CCl₄ (figura 100 C e D), danos que levam a um aumento no peso do fígado. A ruptura das membranas celulares resultou em vazamento de conteúdo intracelular com concomitante elevação de marcadores sanguíneos hepáticos séricos (tabela 23).

A administração do extrato etanólico impediu a degeneração histológica do fígado, os animais tratados com extrato etanólico apresentaram apenas leve degeneração celular, necrose mínima, a regeneração de hepatócitos com a presença de células binucleadas, e uma diminuição dos depósitos de gordura, com a presença de esteatose leve em algumas células (figura 100 E e F), indicando a recuperação da arquitetura normal do fígado. A histoarquitetura geral nesses animais é semelhante aos animais controle e ao grupo Legalon® (figura 100 A e B; G

e H, respectivamente). Estes resultados confirmam o potencial hepatoprotetor do extrato etanólico de *R. induta*.

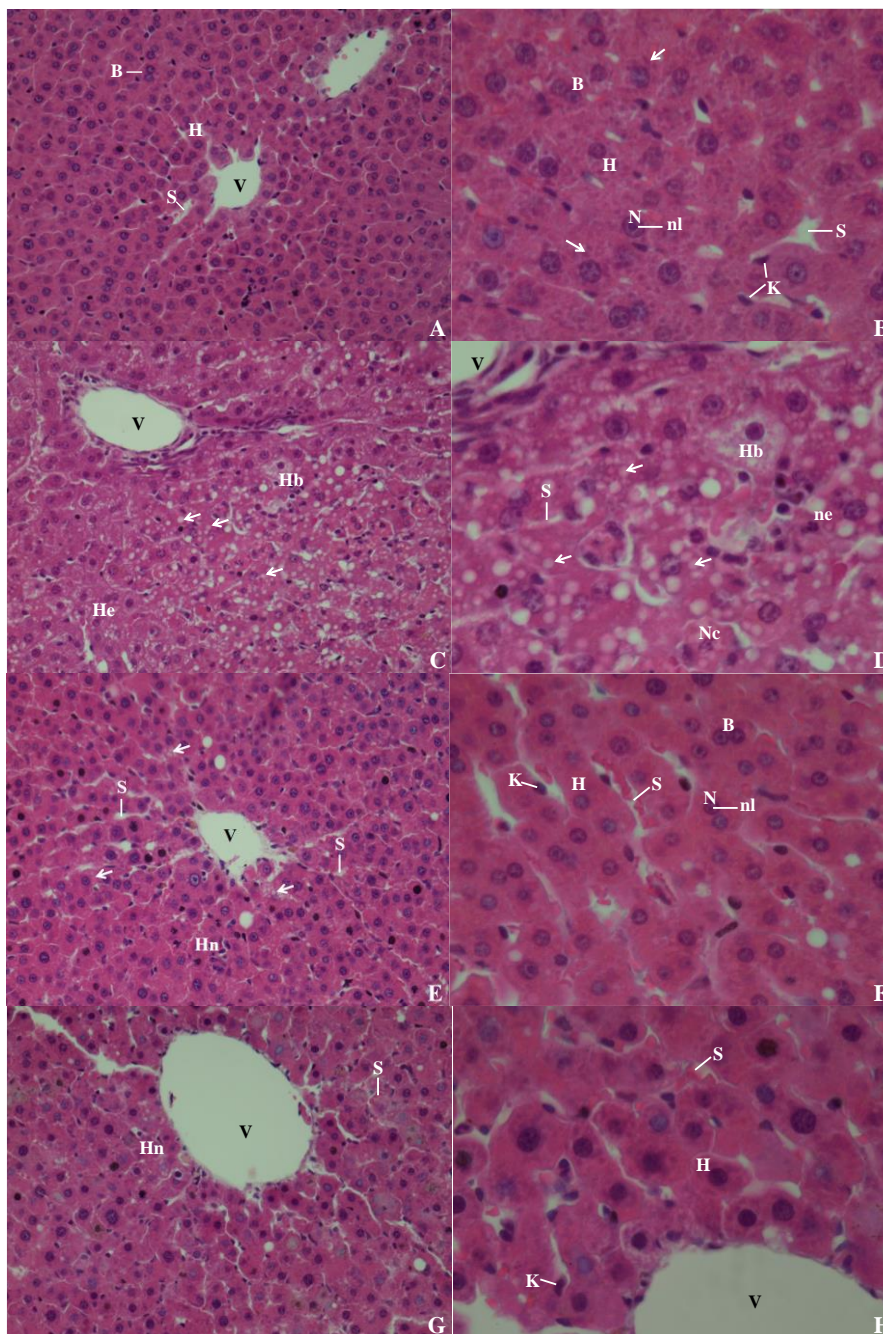


Figura 100 – Fotomicrografias representativas das secções do fígado dos ratos coradas com hematoxilina-eosina para avaliação do efeito hepatoprotetor do extrato etanólico de *Rourea induta*.

(A e B) Secção do fígado do grupo controle, mostrando arquitetura normal sem degeneração e necrose (A, 400X, e B, 1000X); (C e D) Secção do fígado do grupo CCl_4 mostrando danos celulares severos (C, 400X, e D, 1000X); (E e F) Secções do fígado do grupo CCl_4 + extrato etanólico (500 mg/kg) por 7 dias mostrando a regeneração de hepatócitos próxima à arquitetura normal do fígado (E, 400X, e F, 1000X); (G e H) Secções do fígado grupo CCl_4 + Legalon® (50 mg/kg) por 7 dias mostrando regeneração de hepatócitos (G, 400X, e H, 1000X).

H= hepatócito, B=hepatócito binucleado, S= sinusóide, V= veia central, K= células de Kupfer N= núcleo, nl= nucléolo, Flechas em A, B, E e F= grânulos citoplasmáticos, Flechas em C e D = vacúolos lipídicos, He= hepatócito em esteatose, Hb= hepatócito balonizado, Nc= núcleo em cariorrexe, ne= neutrófilo, Hn= necrose de hepatócito.

5.6.7 Toxicidade Aguda

5.6.7.1 Análises comportamentais e bioquímicas

O ensaio de toxicidade aguda é utilizado para se ter uma estimativa de toxicidade de uma planta, e pode fornecer também uma referência de doses que podem ser utilizadas em estudos que compreendam maior duração, como teste de toxicidade subcrônica e crônica.

Ao final dos 14 dias de teste avaliados pela administração oral em camundongos dos extratos aquoso e etanólico de *Rourea induta* em doses únicas de 50, 300 e 2000 mg/kg, v.o., não foram registradas mortalidade e morbidade.

Com relação ao comportamento dos animais foram detectadas alterações com os dois extratos nas maiores doses, tais como agitação, irritabilidade, atrito de patas, sendo os efeitos provocados pelo extrato aquoso mais intensos. Isto pode evidenciar uma possível atividade em nível de sistema nervoso central, visto que os animais da maior dose (2000 mg/kg) em ambos os sexos, apresentaram-se agitados ao longo dos 14 dias experimentais. Apesar disto, não foram detectados sinais de toxicidade, como vômito, diarreia, alteração de apetite, alteração da sede, perda de peso, em ambos os sexos ao longo do experimento, em ambos os extratos, não havendo diferenças no consumo de água, ração, e ganho de peso nas doses administradas.

A avaliação bioquímica da função hepática, realizada através das análises das enzimas AST e ALT está apresentada nas tabelas 25 e 26. Estas enzimas, como descrito anteriormente, são úteis para o diagnóstico e monitoramento do órgão, uma vez que estão presentes em concentrações elevadas nos hepatócitos, sendo os principais marcadores de lesão celular (SILVA *et al.*, 2005; HENRY, 2008). Em uma lesão hepática severa, na qual 80% do fígado está comprometido, estas enzimas podem extravasar para o plasma por meio de diversos mecanismos, o que ocorre comumente através de um dano irreversível à membrana celular seguido de morte celular.

A administração oral aguda do extrato etanólico e do extrato aquoso, em ambos os sexos, não provocou diferença significativa nos níveis de AST e ALT, indicando que não houve uma lesão hepática severa em nível bioquímico.

A avaliação da função renal foi realizada através da dosagem de uréia, um dos testes mais comumente utilizados (LANIS *et al.*, 2008). A uréia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, correspondendo a 75% do nitrogênio não-protéico excretado, sendo 90% excretados pelos rins (SODRÉ, COSTA e LIMA, 2007). Para o extrato etanólico, em ambos os sexos, não houve diferença significativa nos níveis de uréia, não se observando então lesão renal severa em nível bioquímico (tabela 25). Porém, o extrato aquoso provocou uma elevação significativa neste parâmetro no grupo das fêmeas nas doses de 300 e 2000 mg/kg (tabela 26). Esse resultado pode indicar que ocorreu redução na filtração glomerular dos animais, uma vez que isto tem como consequência o aumento da concentração de uréia plasmática.

Tabela 25 – Perfil Bioquímico dos animais tratados por via oral com extrato etanólico de *Rourea induta* após 14 dias

Fêmeas	URÉIA	AST	ALT	COL	TRI	HDL	GLU	PT
Controle	43,9±9,4	93,3±30,9	29,5 ±6,9	66,1±15,9	110,3±44,8	35,8±4,1	247,2±68,4	4,1±0,4
50 mg/kg	47,1±8,6	126,8±44,2	30,1±13,1	83,0±10,1	154,2±58,8	40,6±4,7	147,0±64,0	4,9±0,2
300 mg/kg	44,8±5,6	121,4±31,2	38,3±15,4	82,6±32,7	139,6±51,5	35,8±15,3	132,3±34,6	4,4±0,4
2000 mg/kg	49,7±14,4	184,5±89,8	26,3±16,3	80,7±17,4	159,5±29,8	34,2±6,8	135,0±56,2	4,2±0,8
Machos								
Controle	46,5±2,5	165,1±57,8	30,5±10,5	97,2±6,2	175,4±4,9	50,4±5,7	158,4±65,9	4,6±0,5
50 mg/kg	46,1±8,9	104,5±66,9	30,7±12,6	101,8±21,2	133,6±79,8	51,1±7,4	168,2±73,1	4,4±0,3
300 mg/kg	52,5±4,5	198,2±92,6	34,1±21,4	100,0±25,6	175,6±100,9	48,0±10,0	189,1±27,3	3,9±0,5
2000 mg/kg	51,5±3,6	170,6±114,6	29,0±3,0	86,0±10,4	99,5±24,2	46,7±3,5	114±11,5	4,3±0,1

Os resultados estão apresentados como Média ± Desvio Padrão.

AST: aspartato transaminase (U/L); ALT: alanina transaminase (U/L); COL: colesterol total (mg/dL); TRI: triglicerídeos (mg/dL); HDL: HDL-colesterol (mg/dL); GLU: glucose (mg/dL); PT: proteínas totais (g/dL).

Tabela 26 – Perfil Bioquímico dos animais tratados por via oral com extrato aquoso de *Rourea induta* após 14 dias

Fêmeas	URÉIA	AST	ALT	COL	TRI	HDL	GLU	PT
Controle	43,9±9,4	93,3±30,9	34,8 ±17,4	66,1±15,9	91,5±51,4	35,8±4,1	247,2±68,4	4,1±0,4
50 mg/kg	48,8±4,2	113,2±39,3	54,7±27,1	53,8±9,2	110,3±31,9	37,2±4,3	231,7±62,4	4,2±0,3
300 mg/kg	54,3±5,4*	120,4±75,5	52,0±24,0	53,9±8,4	80,8±28,5	36,9±3,8	219,1±68,8	4,3±0,1
2000 mg/kg	55,3±6,1*	98,0±22,0	38,2±17,6	45,5±8,8*	68,1±14,7	34,6±5,1	120,5±48,0*	4,3±0,2
Machos								
Controle	46,5±2,5	165,1±57,8	38,7±23,7	97,2±6,2	175,4±4,9	50,4±5,7	158,4±65,9	4,6±0,5
50 mg/kg	54,0±8,0	117,3±30,3	46,1±13,2	78,5±33,9	221,5±83,2	51,3±6,6	102,0±40,1	5,2±0,6
300 mg/kg	53,5±14,8	159,0±75,5	49,8±30,7	98,2±20,4	109,1±48,4	57,3±8,6	136,8±33,6	4,6±0,4
2000 mg/kg	49,4±9,9	92,6±28,7	36,6±14,2	98,1±17,5	81,1±26,7*	62,1±9,3*	121,7±33,9	4,6±0,2

Os resultados estão apresentados como Média ± Desvio Padrão.

AST: aspartato transaminase (U/L); ALT: alanina transaminase (U/L); COL: colesterol total (mg/dL); TRI: triglicerídeos (mg/dL); HDL: HDL-colesterol (mg/dL); GLU: glucose (mg/dL); PT: proteínas totais (g/dL).

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Estudos anteriores demonstraram que algumas substâncias são capazes de induzir efeitos tóxicos e farmacológicos predominantemente em um dos sexos do animal devido a variações no metabolismo entre machos e fêmeas (SMOLAREK, 2011). Roff *et al.* (1992) mostraram que algumas isoenzimas da família citocromo P450 existentes no fígado de ratos variam de acordo com o sexo do animal. Variações qualitativas e quantitativas dessas proteínas no fígado de ratos Wistar machos e fêmeas, através de técnica de eletroforese, revelaram a existência de seis proteínas exclusivas de machos e uma exclusiva de fêmeas. Com isso a expressão de proteínas detectadas apenas em um gênero pode resultar em efeitos farmacológicos e toxicológicos diversificados e gênero-dependente, o que justifica apenas o grupo de fêmeas ter apresentado alteração bioquímica.

Nos demais parâmetros bioquímicos avaliados, o extrato etanólico não provocou alteração (tabela 25), enquanto o extrato aquoso apresentou uma redução dos níveis de colesterol total e glucose nas fêmeas, e uma redução de triglicerídeos e aumento de HDL-colesterol nos machos, ambos efeitos observados na dose de 2000 mg/kg (tabela 26).

A diferença na composição dos extratos aquoso e etanólico, e sua metabolização pode justificar os efeitos encontrados, mesmo que para ambos os flavonoides derivados da quercetina sejam os compostos majoritários. A extração

aquosa extrai componentes diferentes do etanol, e sua metabolização pode ter liberado algum composto em maior quantidade, o qual pode estar presente em menor quantidade no extrato etanólico não provocando toxicidade. Com relação aos componentes majoritários destaca-se a quercetina, a qual possui um poder hipocolesterolêmico (ALVES *et al.*, 2010) justificando a redução nos níveis de colesterol neste estudo. Um estudo com coelhos relatou que a quercetina promoveu a redução nos níveis de triglicerídeos. Ela também atua na diminuição da lipoproteína, na prevenção da oxidação lipídica e também no aumento da concentração de HDL (SILVA, BRAGA e SILVA, 2012), efeitos observados para o extrato aquoso nos machos.

5.6.7.2 Avaliação histopatológica

A administração oral aguda dos extratos aquoso e etanólico de *Rourea induta* promoveu alterações histológicas compatíveis com sinais de toxicidade no fígado e rins, quando comparados com o grupo controle. Na avaliação histológica do estômago não houve alteração.

No fígado de ambos os sexos foram observados vacuolização severa de hepatócitos nas doses de 300 e 2000 mg/kg, lesão que ocorre quando um agente interfere no metabolismo dos ácidos graxos da célula, aumentando sua síntese ou dificultando sua utilização, transporte ou excreção. Verificou-se também megalocitose moderada para todas as doses do extrato etanólico e menores doses do aquoso; e megalocitose severa para a maior dose. Foram encontrados hepatócitos binucleados em intensidade severa para todas as doses dos dois extratos (figura 101 A e B, setas 1, 2 e 3 respectivamente), o que pode caracterizar uma tentativa de regeneração hepática. Há pontos de necrose de hepatócitos isolados e perivascularares em graus diferentes de intensidade, moderada para as doses de 50 mg/kg e discreta para as maiores doses dos dois extratos. De acordo com Martins (2011) estas são as primeiras lesões observadas no fígado de animais intoxicados.

Na avaliação histopatológica renal, em ambos os sexos, foram observados congestão discreta em todos os grupos, o que normalmente se observa em processos inflamatórios; concentração de proteínas em túbulos distais (figura 101 C e D seta 4)

moderada nas maiores doses do extrato etanólico, discreta em 50 mg/kg e em todos os grupos do extrato aquoso, o que indica que está havendo perda de proteína, pois em condições normais estas não podem ser observadas em túbulos distais. Observou-se também degeneração hidrópica moderada de epitélio tubular (figura 101 C e D seta 5) nas doses mais elevadas para ambos os extratos, representando lesão celular reversível caracterizada pelo acúmulo de água e eletrólitos. Os efeitos foram mais pronunciados no extrato etanólico, nas doses de 300 e 2000 mg/kg, indicando que este extrato pode ser considerado um agente nefrotóxico pois provoca diminuição da função celular. O extrato aquoso apresentou alterações histológicas compatíveis com sinais brandos de toxicidade (TORRES *et al.*, 2009).

Os rins são órgãos responsáveis pelo controle da homeostase e excreção de metabólitos potencialmente tóxicos, reguladores do volume extracelular, do balanço eletrolítico, e do controle do equilíbrio ácido-básico, portanto lesões neste órgão podem levar a hipotensão, redução na função celular gerando falências irreversíveis (TORRES *et al.*, 2009). Segundo Alves *et al.* (2010), estudos realizados em ratos demonstraram que a administração de quercetina em dosagens superiores a 500 mg/kg pode levar ao aparecimento de lesões neoplásicas renais, o que pode explicar parte das alterações encontradas.

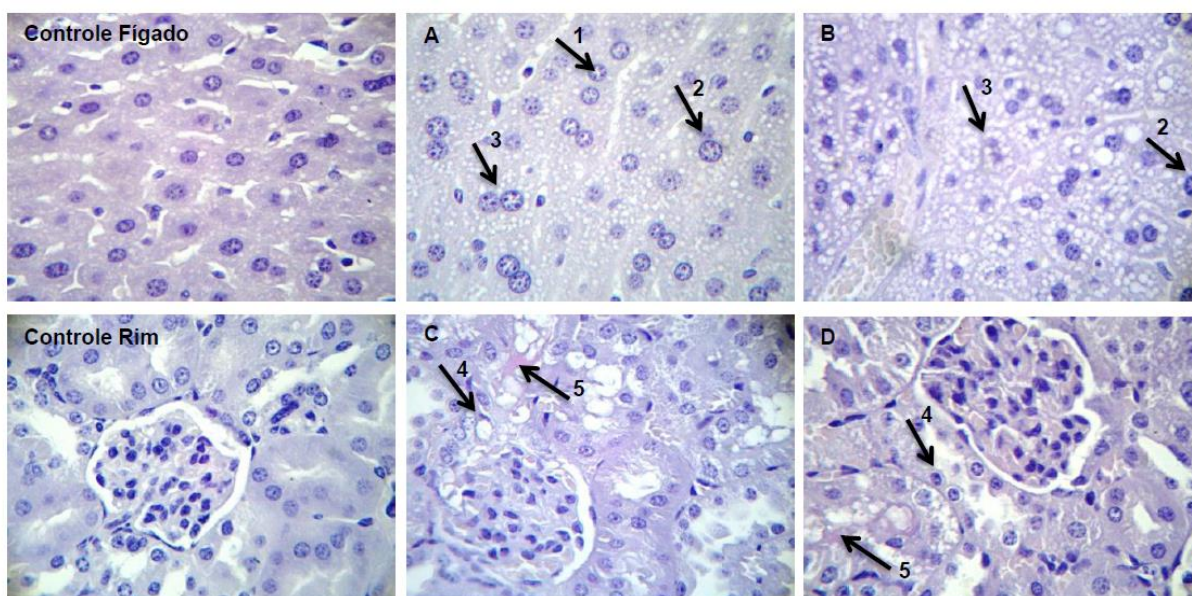


Figura 101 - Avaliação histológica do efeito da administração aguda dos extratos de *Rourea induta* (2000 mg/kg, v.o.) no fígado e nos rins de camundongos.

Em A e C: efeito do extrato etanólico no fígado e rim, respectivamente. Em B e D: efeito do extrato aquoso no fígado e rim, respectivamente. Seta 1: vacuolização de hepatócitos, seta 2: megalocitose, seta 3: hepatócitos binucleados, seta 4: proteínas em túbulos distais e seta 5: degeneração hidrópica de epitélio tubular (400x).

Os resultados histopatológicos juntamente com os resultados das avaliações bioquímicas revelam evidências preliminares da toxicidade dos extratos aquoso e etanólico de *R. induta* em fígado e rins após administração oral aguda dos mesmos, sendo o extrato aquoso tóxico em níveis bioquímicos e histopatológicos, e o extrato etanólico em níveis histopatológicos, ambos em doses acima de 300 mg/kg. Porém para a comprovação dos efeitos tóxicos são necessários estudos posteriores com maior tempo de duração para se ter uma garantia do uso seguro desses extratos.

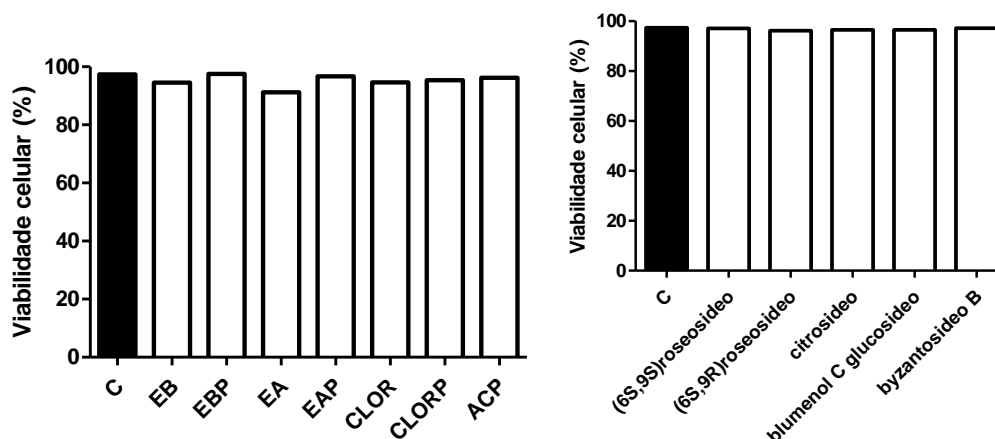
5.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

5.7.1 Viabilidade Celular

Na avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* foram testados todos os extratos e frações de *R. induta*, bem como as amostras filtradas em membrana de poliamida.

Para uma confiança maior nos resultados realizados em células é preciso uma prévia avaliação da viabilidade das células na presença das amostras para verificar se o efeito encontrado não é devido à toxicidade dos extratos sobre as mesmas. As amostras testadas foram avaliadas nas concentrações utilizadas para o teste de nitrito, 100 µg/mL para extratos, e 50 µg/mL para substâncias puras, com 18h de incubação com as células RAW264.7. Após contagem de células viáveis apenas o extrato aquoso (91,2%) apresentou uma viabilidade menor do que 95%, valor considerado ótimo para viabilidade, porém ainda não abaixo de 90%, mas pode-se dizer que ele é a amostra mais agressiva às células. Para as demais amostras, as quais não apresentaram citotoxicidade (gráfico 9), exclui-se a possibilidade de efeito não específico, o que sugere uma seletividade farmacológica (LEE *et al.*, 2006). Para os compostos isolados testados nenhum apresentou toxicidade sobre as células RAW264.7.

Gráfico 9 - Viabilidade celular de células RAW264.7 para os extratos, frações (100 µg/mL) e compostos isolados (50 µg/mL) de *Rourea induta* com 18 h de incubação

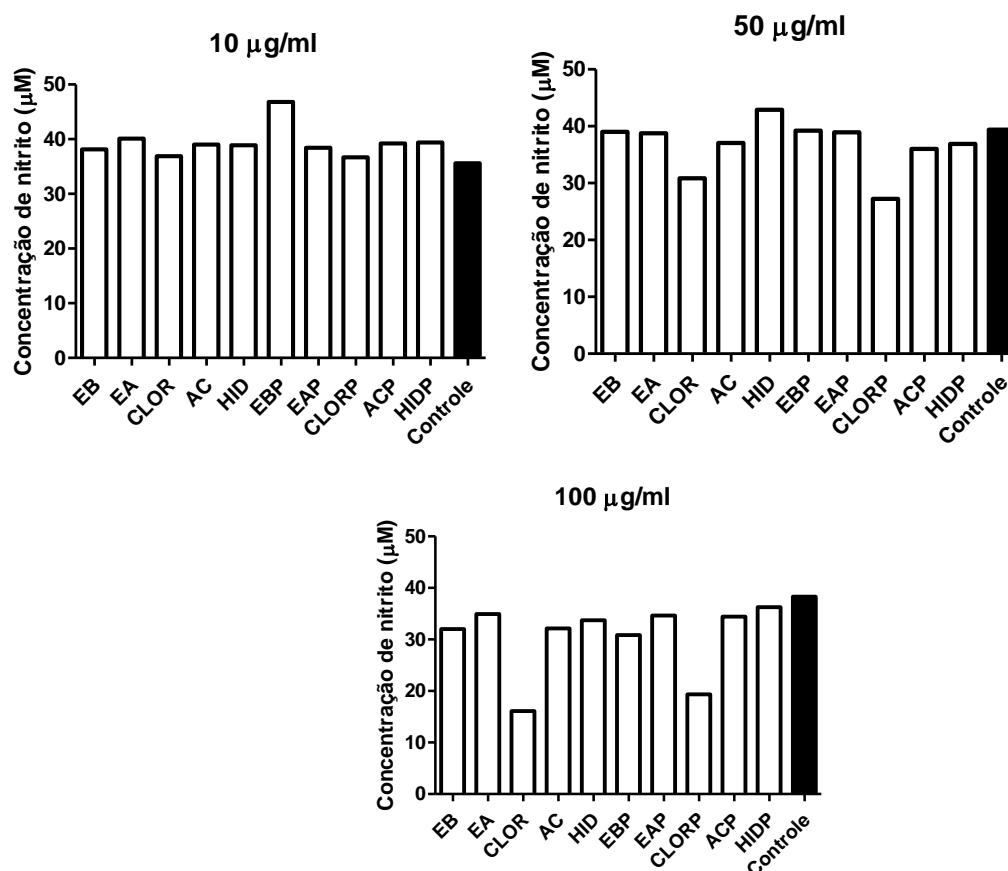


C=controle, EB=extrato bruto etanólico, EBP= extrato etanólico em poliamida, EA=extrato aquoso, EAP= extrato aquoso em poliamida, CLOR=fração clorofórmio, CLORP=fração clorofórmio em poliamida, ACP= fração acetato em polimida.

5.7.2 Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico é conhecido por ser um mediador pró-inflamatório em diversas doenças inflamatórias agudas e crônicas, portanto a diminuição na sua concentração favorece a diminuição da inflamação (LEE *et al.*, 2006). Em células de macrófagos sua produção pode ser estimulada por LPS e IF- γ através da ativação da iNOS, enzima formadora do NO, como se observa no gráfico 10. Inicialmente todos os extratos de *R. induta* foram testados em três concentrações com 24h de estimulação LPS para um primeiro *screening*. Analisando os resultados percebe-se que a partir da concentração de 50 µg/mL tem-se uma pequena redução da concentração de nitrito pelas frações clorofórmio (CLOR) e clorofórmio filtrada em membrana de poliamida (CLORP), sendo a melhor atividade encontrada na concentração de 100 µg/mL (gráfico 10).

Gráfico 10 – Perfil da produção de nitrito por células RAW264.7 na presença dos extratos e frações de *Rourea induta* e 16 h de estimulação LPS



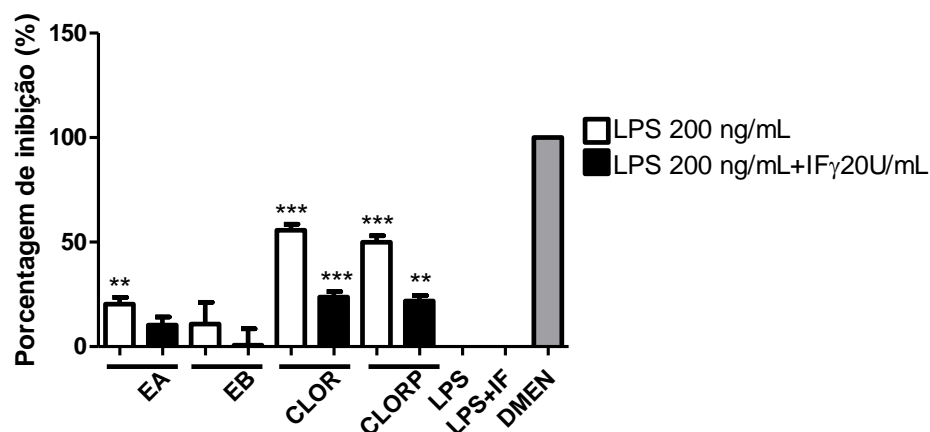
EB=extrato bruto etanólico, EBP= extrato etanólico em poliamida, EA=extrato aquoso, EAP= extrato aquoso em poliamida, CLOR=fração clorofórmio, CLORP=fração clorofórmio em poliamida, AC=fração acetato, ACP=fração acetato em poliamida, HID=fração residual, HIDP=fração residual em poliamida

Portanto, definiu-se trabalhar com as frações CLOR e CLORP na concentração de 100 µg/mL por serem as amostras que apresentaram melhor resultado. Os extratos brutos etanólico e aquoso também continuaram a ser testados. Com essas amostras fez-se uma cinética de estimulação (16, 24 e 48 horas) das células com LPS e LPS/IF- γ para se encontrar o melhor tempo de estimulação, através da qual foi observado que 16 h foi o melhor tempo de estimulação, portanto as quatro amostras foram testadas em triplicata em três experimentos independentes.

Os resultados mostram que as frações CLOR e CLORP foram capazes de reduzir em aproximadamente 50% ($p < 0,001$) a produção de nitrito pelas células RAW264.7 estimuladas com LPS, e em torno de 20% ($p < 0,001$) quando co-estimuladas com LPS/IF- γ (gráfico 11). Já os extratos brutos não apresentaram

atividade inibitória significativa. A redução deste mediador inflamatório pode ser uma chave no controle da inflamação apresentado pela espécie (WEN *et al.*, 2011).

Gráfico 11 – Porcentagem de inibição da produção de nitrito pelas células RAW264.7 na presença dos extratos e frações de *Rourea induta* (100 µg/mL) com 16 h de estimulação LPS e LPS+IF γ



EA=extrato aquoso, EB=extrato bruto etanólico, CLOR=fração clorofórmio, CLORP=fração clorofórmio filtrada em membrana de poliamida.

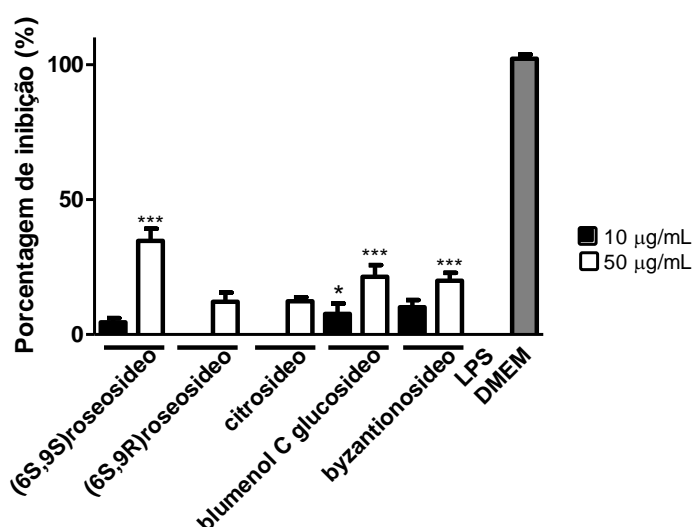
*** $p < 0,001$ vs controle LPS e LPS/ IF- γ

Como já foi discutido anteriormente, o perfil cromatográfico das frações clorofórmio e clorofórmio filtrada em membrana de poliamida é diferente, uma vez que a filtração em membrana de poliamida eliminou boa quantidade dos polifenóis majoritários, porém a atividade de ambas se mostrou muito semelhante. Sabe-se que a hiperina, majoritária na fração CLOR, apresenta uma atividade inibitória da produção de NO *in vitro* comprovada com um CI_{50} de 32,9 µM (LEE *et al.*, 2004), a qual deve estar contribuindo para a atividade desta fração. No entanto, ela não deve ser a única responsável por essa atividade na espécie, pois a fração acetato de etila, a qual possui uma maior concentração deste flavonoide, como visto no doseamento, não provocou inibição da produção de NO, o que leva a pensar que outros compostos, ou mesmo um sinergismo entre este composto majoritário e outros presentes na fração clorofórmio sejam responsáveis pela atividade da fração.

Portanto, como a fração clorofórmio contém flavonoides já conhecidos em grande quantidade, os quais já são amplamente estudados por suas propriedades anti-inflamatórias, partiu-se para o isolamento de substâncias da fração CLORP, a fração filtrada em membrana de poliamida, visando determinar novas substâncias que contribuam para esta atividade.

Da fração CLORP foram isolados os compostos (6S,9S) - roseosideo, (6S,9R) - roseosideo, citrosideo A, blumenol C glucosideo e byzantionosideo B, os quais foram testados em duas concentrações (10 e 50 µg/mL). Na maior concentração o (6S,9S) - roseosideo, blumenol C glucosideo e byzantionosideo B apresentaram uma redução na produção de nitrito pelas células RAW264.7 estimuladas com LPS, 35% para o primeiro e em torno de 20% para os dois últimos. Na concentração de 10 µg/mL apenas o blumenol C glucosideo teve uma redução significativa ($p<0,05$), em torno de 10% (gráfico 12). Na literatura tem-se dados da capacidade de reduzir a produção de NO do (6S,9R) - roseosideo ($IC_{50}= 7,31 \mu M$) (QIU *et al.*, 2008) e não do isômero (6S,9S), enquanto para o byzantionosideo B e blumenol C glucosideo é a primeira vez que esta atividade é descrita. Embora não se possa afirmar que um deles seja o composto responsável pela atividade, pois nenhum foi capaz de inibir sozinho, igual ou mais, a produção de NO do que a fração de origem, as evidências experimentais indicam que esses três compostos contribuem para essa atividade. Provavelmente a ação combinada dos três seja mais efetiva do que as moléculas isoladas. Esta atividade também não está relacionada com efeitos inespecíficos, pois os mesmos não apresentaram citotoxicidade. Essas frações e seus compostos podem ser úteis no tratamento de doenças inflamatórias ao reduzirem a produção de NO, contribuindo para a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da espécie.

Gráfico 12 - Porcentagem de inibição da produção de nitrito pelas células RAW264.7 na presença de compostos isolados dos extratos de *Rourea induta* e 16 h de estimulação LPS

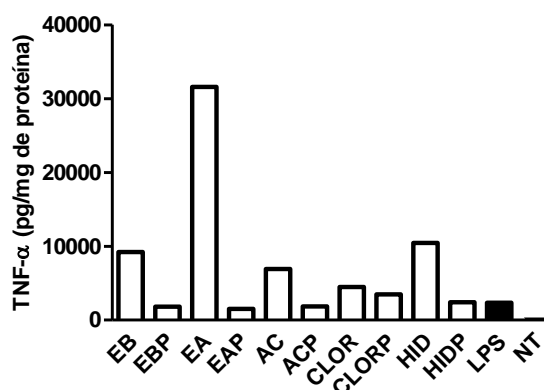


DMEM= controle meio de cultura; *** $p<0.001$ vs LPS; * $p<0.05$ vs LPS

5.7.3 Avaliação da Produção de TNF- α

O TNF- α é conhecido por ser uma citocina pró-inflamatória que possui diversas atividades biológicas associadas à imunopatologia de doenças inflamatórias agudas e crônicas (LEE *et al.*, 2006), pode estar envolvido na febre, destruição tecidual e em alguns casos em choque e até na morte (PUNZÓN, ALCAIDE e FRESNO, 2003). Ela é a primeira citocina detectada em locais inflamados, está presente em menos de 30 min depois do estímulo inflamatório (SANTOS *et al.*, 2006). Em um primeiro *screening* dos extratos de *R. induta* (100 μ g/mL), feito em células RAW264.7 após 16 h de estimulação por LPS (200 ng/mL) das células RAW264.7, percebeu-se que o extrato aquoso filtrado em membrana de poliamida (EAP), o extrato etanólico filtrado em membrana de poliamida (EBP) e a fração acetato de etila também filtrada em membrana de poliamida (ACP) foram as únicas amostras que apresentaram redução na produção de TNF- α (gráfico 13), com as quais prosseguiu-se os testes para confirmação da atividade. As outras amostras não apresentaram inibição, porém algumas provocaram um aumento na concentração de TNF- α , o que ficou bem evidenciado pelo extrato aquoso, o que viria a contrariar o resultado encontrado para os testes *in vivo*, porém como os mecanismos envolvidos *in vivo* e *in vitro* são diferentes, e por se tratar de um extrato complexo, ainda bruto sem purificação, é difícil afirmar o porquê desta diferença.

Gráfico 13 – Perfil de produção de TNF- α por células RAW264.7 na presença dos extratos e frações de *Rourea induta* (100 μ g/mL) e 16 h de estimulação LPS

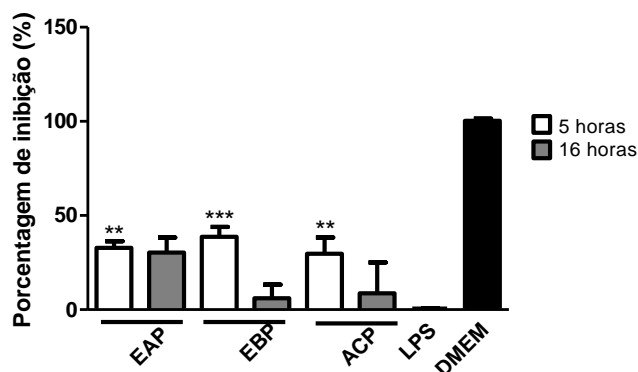


EB=extrato bruto etanólico, EBP= extrato etanólico em poliamida, EA=extrato aquoso, EAP= extrato aquoso em poliamida, CLOR=fração clorofórmio, CLORP=fração clorofórmio em poliamida, AC=fração acetato, ACP=fração acetato em poliamida, HID=fração residual, HIDP=fração residual, NT= não tratado

Com relação às amostras com capacidade de inibir a liberação de TNF- α testou-se um tempo menor de estimulação LPS (5 h), com o qual se obteve uma inibição entre 30-35% para os três extratos. Porém com 16 h de estimulação esta atividade já não se mostrou significativa ($p < 0,05$) (gráfico 14), o que pode indicar que as amostras possuem um potencial anti-inflamatório pela redução da produção de TNF- α , mas esta ação não é estável, ou seja, sua ação dura um certo período de tempo, não sendo observada em um tempo maior de estimulação. Isto pode não ser muito interessante para o tratamento de doenças inflamatórias.

As frações clorofórmio e clorofórmio filtrada em membrana de poliamida, que demonstraram inibição na produção de NO, não apresentaram efeito sobre a produção de TNF- α , o que indica que essas duas amostras atuam em pontos diferentes da cascata de sinalização pró-inflamatória, a produção do TNF- α não está envolvida ação da fração clorofórmio.

Gráfico 14 - Porcentagem de inibição da produção de TNF- α de células RAW264.7 na presença dos extratos e frações de *Rourea indica* (100 μ g/mL) e estimulação LPS



EBP= extrato etanólico em poliamida, EAP= extrato aquoso em poliamida, ACP=fração acetato em poliamida, DMEM= controle meio de cultura *** $p < 0,001$ vs LPS; ** $p < 0,01$ vs LPS

5.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.8.1 Triagem *in vitro* de Atividade Tripanocida e Leishmanicida

O extrato aquoso, o extrato etanólico e suas frações provenientes foram testados contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de

Leishmania braziliensis, cujos resultados expressos em CI_{50} são apresentados na tabela 27.

Tabela 27 - Atividade tripanocida e leishmanicida dos extratos e frações de *Rourea induta*

Amostra	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) <i>T. Cruzi</i>	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) <i>L. Braziliensis</i>
Extrato aquoso	763,37	463,33
Extrato bruto etanólico	>1000	864,5
Fr. Hexano	>1000*	<1000*
Fr. Clorofórmio	>1000	>1000
Fr. acetato de etila	832,68	748,87
Fr. Residual	>1000	770,9
Anfotericina B	-	0,37
Benzonidazol	13,60	-

*não foi possível calcular pois houve interferência da fração na leitura no UV, o resultado foi analisado visualmente no microscópio

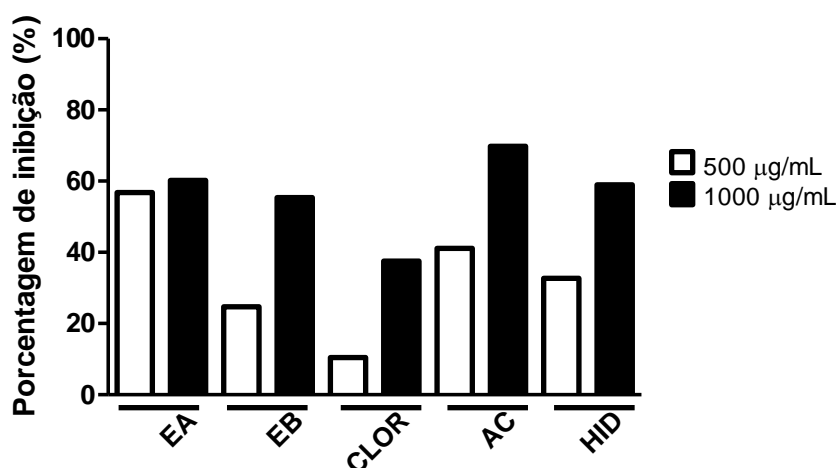
Analisando os valores de CI_{50} é possível dizer que a linhagem de *L. braziliensis* se mostrou um pouco mais sensível às amostras de *R. induta* do que a linhagem de *T. cruzi*, pois somente a fração clorofórmio apresentou um CI_{50} acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$, as demais obtiveram CI_{50} menores, porém valores que não podem ser considerados atividade significativa. O extrato aquoso teve o menor valor de um CI_{50} contra *L. braziliensis* (463,33 $\mu\text{g/mL}$), seguido pelas frações acetato de etila e residual, as quais apresentaram valores próximos, e depois o extrato bruto com uma $CI_{50} = 864,5 \mu\text{g/mL}$. Se forem observados os valores de porcentagem de inibição de crescimento dos parasitas (tabela 28 e gráfico 15) pelas amostras na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ percebe-se que todas as amostras inibiram o crescimento de *L. braziliensis*, com exceção da fração clorofórmio. Para a fração hexano não foi possível fazer o cálculo de CI_{50} e porcentagem de inibição, pois a coloração da fração interferiu na leitura no UV levando a um resultado errôneo, portanto para esta amostra foi realizada somente uma visualização microscópica, através da qual se percebeu que na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ a maioria dos parasitas estavam inviáveis e na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ estavam todos vivos, o que indica que sua CI_{50} está entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 28 - Porcentagem de inibição das linhagens de *T. cruzi* e *L. braziliensis* na presença dos extratos e frações de *Rourea induta*

Amostra	Porcentagem (%) de inibição de <i>T. cruzi</i>		Porcentagem (%) de inibição de <i>L. braziliensis</i>	
	1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL
Extrato aquoso	87,99	-	60,20	56,78
Extrato bruto etanólico	25,34	-	55,41	24,68
Fr. Hexano	Nd	-	Nd	Nd
Fr. Clorofórmio	1,27	-	37,57	10,46
Fr. acetato de etila	85	-	54,82	41,15
Fr. Residual	-	-	58,95	32,68

nd - não determinado pois houve interferência da fração na leitura no UV, o resultado foi analisado visualmente no microscópio.
- não houve inibição.

Gráfico 15 – Porcentagem de inibição de *Leishmania braziliensis* pelos extratos e frações de *Rourea induta* (1000 µg/mL e 500 µg/mL)

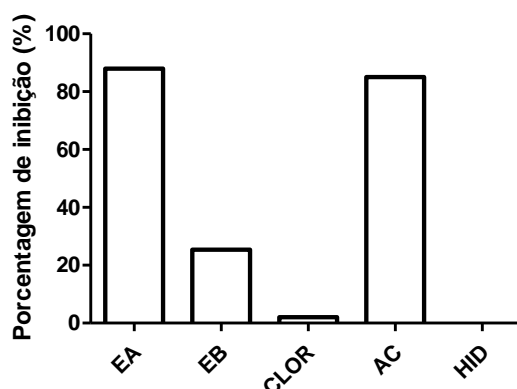


EA= extrato aquoso, EB= extrato bruto etanólico, CLOR= fração clorofórmio, AC= fração acetato de etila, HID= fração residual.

Na triagem da atividade tripanocida obteve-se duas amostras com CI_{50} inferiores a 1000 µg/mL, o extrato aquoso (CI_{50} = 763,37 µg/mL) e a fração acetato de etila (CI_{50} = 832,68 µg/mL), valores elevados que demonstram que essas amostras não tem atividade contra *T. cruzi*. Pelas porcentagens de inibição percebe-se que somente a fração residual não inibiu o crescimento dos parasitas. Todas as demais amostras apresentaram inibição, sendo o extrato aquoso e a fração acetato as amostras com maior inibição, em torno de 85%, corroborando com os valores de CI_{50} das mesmas (tabela 28 e gráfico 16). O extrato etanólico e a fração clorofórmio apresentaram valores de CI_{50} acima de 1000 µg/mL, os quais inibiram o crescimento dos parasitas em quantidade não muito expressiva. A fração hexano também

apresentou interferência na leitura deste teste, e por visualização microscópica percebeu-se que todos os parasitas estavam viáveis na concentração de 1000 µg/mL, portanto esta fração tem uma CI_{50} acima de 1000 µg/mL não apresentando atividade tripanocida.

Gráfico 16 – Porcentagem de inibição de *Trypanossoma cruzi* pelos extratos e frações de *Rourea induta* (1000 µg/mL)



EA= extrato aquoso, EB= extrato bruto etanólico, CLOR= fração clorofórmio, AC= fração acetato de etila, HID= fração residual.

Os resultados indicam não há atividade expressiva contra *L. braziliensis* e *T. cruzi*, os valores de CI_{50} são muito elevados quando comparados aos controles positivos de benzonidazol (CI_{50} = 13,60 µg/mL) para *T. cruzi* e anfotericina B (CI_{50} = 0,37 µg/mL) para *L. braziliensis* (NAKAMURA *et al.*, 2006). Como espécies da família Connaraceae já demonstraram atividades antiparasitárias, como *Rourea minor* que possui atividade contra *Plasmodium falciparum* causador da malária (HE *et al.*, 2006), e os parasitas em estudo serem causadores de doenças que acometem a população brasileira, cujos tratamentos não são eficazes, são tóxicos e de pouca pesquisa na indústria farmacêutica (SIQUEIRA *et al.*, 2010), pesquisou-se a atividade da espécie *R. induta* na tentativa de encontrar novas possibilidades para o tratamento de leishmanioses e doença de Chagas, porém os resultados encontrados não se mostraram tão promissores. Talvez um estudo mais específico nesta área com o extrato aquoso, o qual mostrou melhor atividade, consiga encontrar uma atividade significativa que possa vir a contribuir no tratamento dessas doenças.

5.8.1.1 Viabilidade celular em cultura de células J774.A1

Um dos critérios na pesquisa de compostos antiparasitários é definir se as amostras não apresentam efeitos citotóxicos no hospedeiro (NAKAMURA *et al.*, 2006). Portanto, para concluir se a atividade contra os parasitas é específica ou não é preciso analisar a seletividade da ação através de um teste de citotoxicidade celular (células J774.A1), para calcular o índice de seletividade (CC_{50}/CI_{50}) (OSÓRIO *et al.*, 2007). Se a amostra apresentar uma citotoxicidade elevada significa que ela atinge o parasita através de efeitos inespecíficos devido a sua toxicidade celular, não há uma ação seletiva contra o parasita; por outro lado uma citotoxicidade baixa e uma alta atividade antiparasitária indica que a amostra é seletiva e age somente no parasita.

Analisando as concentrações citotóxicas e os índices de seletividade (tabela 29 e gráfico 17) pode-se observar que nenhuma amostra se mostrou muito seletiva ao parasita, todas apresentaram uma concentração citotóxica semelhante à concentração inibitória de 50%, resultando em índices de seletividade baixos, o que significa que as amostras apresentam citotoxicidade e não possuem ação seletiva contra os parasitas testados, ou seja, suas atividades antiparasitárias podem ser devidas a efeitos inespecíficos da amostra.

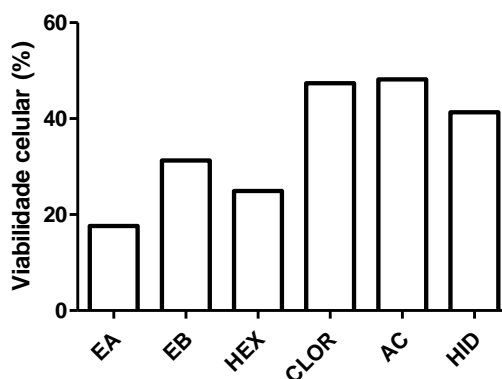
Tabela 29 - Citotoxicidade sobre células J774.A1 e índice de seletividade dos extratos e frações de *Rourea induta*

Amostra	CC ₅₀ (µg/mL)	IS <i>T. cruzi</i>	IS <i>L. braziliensis</i>
Extrato aquoso	594,21	0,78	1,28
Extrato bruto etanólico	891,3	0,67	1,03
Fr. Hexano	725,1	>0,72	Nd
Fr. Clorofórmio	1048,92	0,41	0,82
Fr. acetato de etila	1070,87	1,29	1,43
Fr. Residual	1017,93	>1,01	1,32

Nd = não determinado

IS = índice de seletividade

Gráfico 17 – Viabilidade celular de células J774.A1 na presença dos extratos e frações de *Rourea induta* (1000 µg/mL)



EA = extrato aquoso, EB = extrato bruto etanólico, HEX= fração hexano, CLOR = fração clorofórmio, AC = fração acetato de etila, HID = fração residual

5.8.2 Atividade Antifúngica

Os extratos e frações foram testados frente a linhagens de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Aspergillus fumigatus*, cujos resultados de concentração inibitória mínima são demonstrados na tabela 30.

Tabela 30 – Atividade antifúngica dos extratos e frações de *Rourea induta*

Amostra	CIM (µg/mL) <i>C. albicans</i>	CIM (µg/mL) <i>C. parapsilosis</i>	CIM (µg/mL) <i>A. fumigatus</i>
Extrato aquoso	>1000	>1000	>1000
Extrato bruto etanólico	>1000	>1000	>1000
Fr. Hexano	256	64	>256
Fr. Clorofórmio	256	>256	>256
Fr. acetato de etila	64	16	>256
Fr. Residual	>256	>256	>256
Itraconazol	1,0	0,5	1,0
Fluconazol	4	4	-

- : não testado

Observando os resultados percebe-se que as amostras foram ativas contra as leveduras *C. parapsilosis* e *C. albicans*, sendo a cepa de *C. parapsilosis* a mais sensível aos extratos de *R. induta*. A fração acetato de etila foi a mais ativa nos dois casos, CIM de 16 µg/mL para *C. parapsilosis* e para *C. albicans* CIM de 64 µg/mL. A fração hexano foi mais ativa contra *C. parapsilosis* (CIM = 64 µg/mL), já a fração

clorofórmio apresentou atividade contra *C. albicans* (CIM = 256 µg/mL) e nenhuma atividade contra *C. parapsilosis*. Os extratos brutos aquoso e etanólico, assim como a fração residual, não foram ativos contra nenhuma das leveduras até as concentrações de 1000 µg/mL e 256 µg/mL para a fração.

Com relação ao fungo filamentoso *A. fumigatus*, um fungo altamente resistente, nenhuma amostra apresentou atividade até 1000 µg/mL.

As leveduras do gênero *Candida* podem acometer o ser humano de diversas maneiras, desde infecções superficiais de pele e mucosas até infecções viscerais, podendo se disseminar por todo o organismo. As candidíases cutâneas podem acometer indivíduos sãos ou imunodrepimidos, comumente identificadas por infecções bucais (sapinho), e da mucosa vaginal, ambas causadas frequentemente por *Candida albicans*, mas podem também ser causadas pela *C. parapsilosis*. As candidíases sistêmicas possuem um mecanismo diferente e seu diagnóstico é difícil e demorado, mas a maior parte delas é causada por *C. albicans*, seguida por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis* (INSTITUT PASTEUR, 2011).

Portanto pode-se dizer que as frações derivadas do extrato etanólico de *R. induta* apresentam atividade contra leveduras que acometem a saúde do ser humano, principalmente a fração acetato de etila, sendo a mais ativa contra duas linhagens. Esta fração pode ser uma potencial fonte de produtos ativos contra as mesmas, porém os compostos isolados dela (epicatequina, hiperina, quercetina, quercetina-3-O- α -arabinofuranosideo, quercetina-3-O- β -xilosideo, isoquercetrina e guaijaverina) foram igualmente testados e não se mostraram ativos, o que leva a pensar que a atividade encontrada é devida a uma associação entre os mesmos. Uma mistura de flavonoides como essa pode ser responsável por uma atividade antifúngica, uma vez que a atividade anti-*Candida* de alguns flavonoides já foi demonstrada (CUSHNIE e LAMB, 2005).

5.8.3 Atividade Antibacteriana

A atividade dos extratos sobre linhagens de bactérias é apresentada na tabela 31. Os extratos brutos se mostraram mais ativos do que as frações contra *S. aureus*, com concentrações inibitórias abaixo de 100 µg/mL, sendo o extrato aquoso

o mais ativo (CIM= 39 µg/mL). Para *E. faecalis* somente o extrato aquoso foi ativo (CIM = 78 µg/mL), e para as outras duas linhagens os extratos brutos apresentaram a mesma atividade, porém não muito significativa, uma vez que as concentrações estão acima de 1000 µg/mL. Segundo Holetz *et al.* (2002) CIM menores do que 100 µg/mL representam uma boa atividade antibacteriana.

Entre as frações testadas somente a fração acetato de etila apresentou atividade contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* com concentrações inibitórias de 100, 200 e 200 µg/mL respectivamente, uma atividade considerada moderada (HOLETZ *et al.*, 2002). As demais frações tiveram concentrações acima de 200 µg/mL, não sendo significativo.

Pode-se dizer então que os extratos brutos de *R. induta* possuem boa atividade contra bactérias gram positivas, como *S. aureus* e *E. faecalis*, causadoras de infecções cutânea; endocardites, bacteremia e infecções do trato urinário, respectivamente; e são inativos contra bactérias gram negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa*; e a fração acetato de etila apresenta atividade moderada contra os dois tipos de bactérias.

E. coli e *P. aeruginosa* são linhagens que causam uma série de problemas, como diarreias, cistites e meningite neonatal; infecções pulmonares, gastrointestinais entre outras infecções oportunistas, respectivamente, o que pode se agravar em caso de pacientes imunocomprometidos. Ambas foram inibidas pela fração acetato de etila, um resultado interessante e promissor uma vez que o controle dessas linhagens é difícil (SHARMA *et al.*, 2009).

Tabela 31 – Atividade antibacteriana dos extratos e frações de *Rourea induta*

Amostra	CIM (µg/mL) <i>S. aureus</i>	CIM (µg/mL) <i>E. coli</i>	CIM (µg/mL) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (µg/mL) <i>E. faecalis</i>
Extrato aquoso	39	1250	2500	78
Extrato bruto etanólico	78	1250	2500	>5000
Fr. Hexano	>200	>200	>200	>200
Fr. Clorofórmio	>200	>200	>200	>200
Fr. acetato de etila	100	200	200	>200
Fr. residual	>200	>200	>200	>200

Nota: *S. aureus* ATCC 25923; *E. coli* ATCC 25922; *P. Aeruginosa* ATCC 27853 ; *E. faecalis* ATCC 29212.

O uso de plantas e de seus compostos com atividade antimicrobiana é de grande valia para o tratamento de diversas doenças, esse tipo de pesquisa vem crescendo cada vez mais em todos os países. Espécies da família Connaraceae já apresentaram atividade antibacteriana, como *Rourea santaloides* contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, bem como *Cnestis ferruginea*, *Byrsocarpus coccineus* e *Manotes langiflora* que possuem atividade contra *S.aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (BOAKYE-YIADOM e KONNING, 1975).

5.9 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

5.9.1 Citotoxicidade sobre Células KB e MRC5

Células da linhagem KB são células de carcinoma cervical uterino (O'NEILL, 2009), já as células MRC5 correspondem a células normais, não tumorais. Os extratos foram testados na concentração de 10 µg/mL e foram calculadas as porcentagens de inibição do crescimento de ambas as células, cujos resultados são expressos na tabela 32 como média e desvio padrão.

Tabela 32 – Citotoxicidade dos extratos e frações de *Rourea induta* sobre células KB e MRC5

Amostra	KB (% inibição)	MRC5 (% inibição)
Extrato aquoso	0±10	0±7
Extrato aquoso em poliamida	0±14	0±8
Extrato etanólico	0±7	10±4
Extrato etanólico em poliamida	0±16	0±6
Fração hexano	25±10	28±15
Fração clorofórmio	0±2	15±3
Fração clorofórmio em poliamida	0±15	0±1
Fração acetato de etila	0±2	0±4
Fração acetato de etila em poliamida	0±10	0±3
Fração residual	0±17	0±1

Analisando as porcentagens de inibição encontradas pode-se concluir que as amostras testadas não apresentam citotoxicidade contra nenhum dos tipos de linhagem celular testada, nenhuma amostra apresentou uma inibição acima de 90%, sendo a maioria próxima de 0% de inibição, demonstrando uma baixa toxicidade nessa concentração. A fração hexano apresentou a maior porcentagem, em torno de 25%, porém ainda baixa para ser considerada citotóxica.

Com relação às células MRC5 é interessante que os extratos não sejam citotóxicos, pois uma toxicidade sobre células normais do organismo é prejudicial. Já com relação às células KB buscava-se uma citotoxicidade para uma possível utilização dos extratos como agentes antitumorais, uma vez que inibindo a proliferação de células tumorais *in vitro* espera-se que existam substâncias anticancerígenas, porém nenhuma amostra apresenta uma possível atividade citotóxica (TEMPÊTE *et al.*, 1995; TAI *et al.*, 1998).

5.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A lise de hemácias pode levar o paciente à exposição de efeitos deletérios da hemoglobina livre no plasma, a qual apresenta efeitos adversos nos rins e sistema cardiovascular, portanto a atividade hemolítica está relacionada à toxicidade de extratos (CARVALHO *et al.*, 2007).

5.10.1 Hemólise em Tubo

Os resultados obtidos por este método indicaram que nenhuma amostra (extratos e frações) possui atividade hemolítica nas concentrações testadas. No tubo após a centrifugação todas as amostras apresentaram os sobrenadantes límpidos e um precipitado de hemácias, o que indica que os extratos de *Rourea induta* não são tóxicos para as células vermelhas do sangue, como pode ser observado na figura 102.

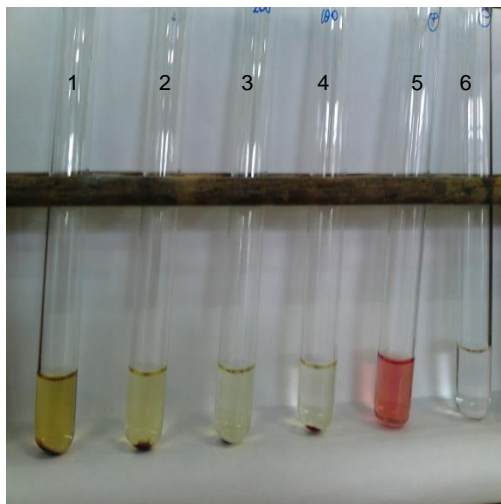


Figura 102 - Atividade Hemolítica da Fração Clorofórmio
Nota: 1) 1000 $\mu\text{g/mL}$, 2) 500 $\mu\text{g/mL}$, 3) 200 $\mu\text{g/mL}$, 4) 100 $\mu\text{g/mL}$,
5) controle positivo, 6) controle negativo.

5.10.2 Hemólise por Difusão em Ágar Sangue

A atividade hemolítica por meio da difusão em ágar sangue confirmou os resultados obtidos no teste de hemólise em tubo, nenhuma amostra testada apresentou a formação de halos de hemólise ao redor dos discos impregnados com amostras na concentração de 1000 μg , comparados ao controle positivo triton X-100 que apresentou um halo de 2 cm.

Como a atividade hemolítica pode ser relacionada à toxicidade aguda de extratos, devido a efeitos nocivos nos rins, como nefrotoxicidade, e no sistema cardiovascular (Carvalho *et al.*, 2007), um resultado negativo é interessante, pois indica que estes extratos não causam efeitos tóxicos às membranas dos eritrócitos humanos, o que estimula a continuação de estudos com a espécie.

6 CONCLUSÃO

Os objetivos propostos para o estudo da espécie *Rourea induta* foram atingidos e as conclusões estabelecidas estão listadas a seguir:

- Treze compostos foram isolados e identificados. Da fração acetato de etila: epicatequina, guaijaverina, isoquercetrina, ácido 5-O-cafeoilquínico metil éster e procianidina B2. Do extrato aquoso: procianidina C1, ácido clorogênico e ácido neoclorogênico. E da fração clorofórmio filtrada em membrana de poliamida: (6S,9S)-roseosideo, (6S,9R)-roseosideo, citrosideo A, byzantionosideo B e blumenol C glucosideo. Compostos ainda não descritos para essa espécie;
- Foi desenvolvido e validado um método de quantificação de flavonoides em CLAE. Por meio deste foi possível confirmar que a hiperina é o composto majoritário do extrato, e indicá-la como um marcador confiável para o desenvolvimento de um fitoterápico;
- O extrato aquoso via oral apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório através de inibição da nocicepção nas duas fases do teste da formalina em camundongos;
- No teste de dor crônica induzida pelo CFA, a administração aguda e crônica do extrato aquoso apresentou efeito redutor da hipersensibilidade mecânica de 2 h sem efeito cumulativo, e apresentou efeito anti-inflamatório pela redução das citocinas TNF- α e IL-1 β na pata e medula espinhal dos camundongos;
- O sistema opióide não está envolvido no mecanismo antinociceptivo do extrato aquoso;
- O extrato aquoso foi capaz de inibir a nocicepção provocada pela injeção intratecal de TNF- α em camundongos;

- A administração do extrato etanólico por via oral foi capaz de prevenir o dano hepático induzido em ratos Wistar tratados durante sete dias, ao se observar o retorno à normalidade de parâmetros bioquímicos de avaliação da função hepática (AST, ALT, BT);
- O extrato etanólico apresentou ação antioxidante ao inibir a peroxidação lipídica, aumentar o conteúdo da GSH e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) após intoxicação de ratos Wistar com CCl₄ em um tratamento de sete dias;
- Os extratos etanólico e aquoso apresentaram sinais brandos de toxicidade renal e hepática quando administrados em camundongos em dose única e avaliados por 14 dias;
- A fração clorofórmio e clorofórmio filtrada em membrana de poliamida, obtidas do extrato etanólico de *R. induta*, apresentaram 50% de inibição na produção de óxido nítrico por células RAW264.7; e os compostos isolados (6S,9S)-roseosideo, byzantionosideo B e blumenol C glucosideo apresentaram aproximadamente 30% de inibição;
- A produção de TNF- α por células RAW264.7 foi inibida pelo extrato aquoso filtrado em membrana de poliamida, extrato etanólico filtrado em membrana de poliamida e fração acetato de etila filtrada em membrana de poliamida com 5 h de estimulação LPS, porém esta atividade é perdida com 16 h de estimulação;
- Não foi encontrada atividade leishmanicida e tripanocida em todas as amostras testadas,
- A fração acetato de etila (CIM = 64 μ g/mL), hexano (CIM = 256 μ g/mL) e clorofórmio (CIM = 256 μ g/mL), originadas do extrato etanólico, apresentaram atividade contra *C. albicans*, e as duas primeiras foram ativas contra *C. parapsilosis* (CIM = 16 μ g/mL e 64 μ g/mL);

- Os extratos aquoso e etanólico de *R. induta* apresentaram atividade contra bactérias gram positivas, *S. aureus* e *E. faecalis* (CIM = 39; 78 e 78 µg/mL) e uma baixa atividade contra bactérias gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*. A fração acetato de etila apresentou atividade contra os dois tipos de bactérias;
- Nenhuma amostra apresentou citotoxicidade contra células KB e MRC5 nem atividade hemolítica.

REFERÊNCIAS

- ADISA, R.A. *et al.* Hypoglycaemic and biochemical properties of *Cnestis ferruginea*. **African Journal of Tradicional Complementary and Alternative Medicines**, v.7, n.3, p.185-194, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003**: Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Brasília, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução n. 14 de 31 de março de 2010**: Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, 2010.
- AGNIHOTRI, S.; WAKODE, S.; AGNIHOTRI, A. An overview on anti-inflammatory properties and chemo-profiles of plants used in tradicional medicine. **Indian Journal of Natual Products and Resources**, v.1, n.2, p.150-167, 2010.
- AGUIAR, R. M. *et al.* Relação estrutura atividade antioxidante de quercetina e seus derivados glicosilados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2009.
- AKBARI, E.; MIRZAEI, E.; MAJDA, N. S. Long-term Morphine-treated Rats are more Sensitive to Antinociceptive Effect of Diclofenac than the Morphine-naive rats. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 1, p.175-184, 2013.
- AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Antiinflammatory activity of the extract of *Byrsocarpus coccineus*. **Fitoterapia**, v.78, p.25-28, 2007a.
- AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Antipyretic Activity of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn (Connaraceae). **International Journal of Pharmacology**, v.3, n.4, p.357-361, 2007b.
- AKINDELE A. J.; ADEYEMI, O. O. Anxiolytic and sedative effects of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae) extract. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.3, n.1, p.28-36, 2010.
- AKINDELE, A. J. *et al.* Hepatoprotective and in vivo antioxidant effects of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, p.46-52, 2010.
- ALBERNAZ, L. C. **Atividades antiparasitárias e antifúngicas de plantas do cerrado: *Spiranthera odoratissima* et *Diospyros hyspid***. 307f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.
- ALONSO, J. R. **Fitomedicina, curso para profissionais da área da saúde**. São Paulo: Pharmabooks Ed., 2008.

ALVES, A. M. P. *et al.* Aspectos gerais e abordagem terapêutica da quercetina sobre as complicações do diabetes causadas pelo estresse oxidativo. **Arquivos de Ciência da Saúde da UNIPAR**, v.14, n.2, p.179-186, 2010.

AÑEZ, R. B. S. **O uso de plantas medicinais na comunidade do Garcês (Cáceres, Mato Grosso)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 1999.

AYRES, M. C. C. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.90-97, 2008.

BASBAUM, A.I. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v.24, p. 5967, 1999.

BARTLETT, P. A.; McLAREN, K. L.; MARX, M. A. Divergence between the enzyme-catalyzed and noncatalysed synthesis of 3-dehydroquinone. **Journal of Organic Chemistry**, v.59, p.2082-2085, 1994.

BEHLING, E. B. *et al.* Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.3, p.285-292, 2004.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.61, p.882-888, 1963.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.8, n.2, p.47-51, 2007.

BOAKYE-YIADOM, K.; KONNING, G. H. Incidence of antibacterial activity in the Connaraceae. **Planta Medica**, v.28, p.397-400, 1975.

BOBINSKI, F. *et al.* Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v.194, p.337-348, 2011.

BORTOLANZA, L. B. *et al.* Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.453, p.203-208, 2002.

BOUKTAIB, M.; ATMANI, A.; ROLANDO, C. Regio- and stereoselective synthesis of the major metabolite of quercetin, quercetin-3-O- β -D-glucuronide. **Tetrahedron Letters**, v.43, p.6263-6266, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 60 p., 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso**. 8 ed. rev., Brasília, 444 p., 2010.

BRITO, N. J. N. **Avaliação antioxidante de *Turnera ulmifolia***. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

CARVALHO, E. B. *et al.* Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrado de hemácias. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.2, p.149-152, 2007.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor. Atualização terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 49, n. 3, p. 221-240, 1998.

CHAN, T. F.; TSAI, H. Y.; TIAN-SHANG, W. Anti-inflammatory and analgesic activities from the roots of *Angelica pubescens*. **Planta Medica**, v.61, p.2–8, 1995.

CHAN, E. W. C. *et al.* Caffeoylequinic acids from leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae). **LWT – Food Science and Technology**, v.42, p.1026-1030, 2009.

CHO, J. Y. *et al.* In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. **European Journal of Pharmacology**, v.398, n.3, p.399-407, 2000.

CHOI, J.-H. *et al.* Protective effects of hyperoside against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Journal of Natural Products**, v.74, p.1055-1060, 2011.

CHOI, Y. H. *et al.* NMR Metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. **Journal of Natural Products**, v.69, p.742-748, 2006.

CONCEIÇÃO, G. M. *et al.* Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena**, v. 7, n.12, p.1-6, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p.241-256, 2009.

CRONQUIST (1968). **Sistemática de Angiospermas do Brasil, Classificação Segundo Cronquist**, v.2, 1984.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p.343-356, 2005.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R.; YASUDA, M. A. S. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, n.1, p. 123-125, 2014.

DRAY, A. Peripheral mediators of pain. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. (eds). **The Pharmacology of Pain**. Berlin: Springer Verlag, 1997. v.130/I, p.21-41

EFING, L. M. A. C. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.).** 108f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5.ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FINE, A. M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. **Alternative Medicine Review**, v.5, n.2, p.144-151, 2000.

FLUKA CHEMIKA, **Silylation agents**. Switzerland: Fluka Chemie AG, 1995.

FONSECA, L. C. M.; PROENÇA, C. E. B. **Connaraceae. Flora do Distrito Federal.** Brasília: Embrapa/Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2002. v.2

FOO, L. Y.; KARCHESY, J. J. Procyanidin dimmers and trimers from Douglas fir inner bark. **Phytochemistry**, v.28, n.6, p.1743-1747, 1989.

FORERO, E. A revision of the American species of *Rourea* subgenus *Rourea* (Connaraceae). **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v.26, n.1, p.1-119, 1976.

FORERO, E. Uma nueva especie mexicana de *Rourea* (Connaraceae). **Caldasia**, Bogotá, v.29, n.1. p.19-21, 2007.

FORERO, E. **Connaraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6958>>. Acesso em 15/08/2013.

GARDÈS-ALBERT, M. *et al.* Espèces réactives de l'oxygène, comment l'oxygène peut-il devenir toxique? **Mécanismes biochimiques**, p.91-96, 2003.

GAETANI, G. F. *et al.* Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v.73, n.1, p.334-339, 1989.

GÜVENALP, Z.; DEMIREZER, L. Ö. Flavonol glycosides from *Asperula arvensis* L. **Turkish Journal of Chemistry**, v.29, p.163-169, 2005.

GUZHVA, N. N. Flavonoids and hydroxycinnamic acids from *Astragalus asper*, **Chemistry of Natural Compounds**, v.46, n.2, p.303-304, 2010.

HE, Z-D. *et al.* Rourinoside and rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. **Phytochemistry**, v.67, p.1378-1384, 2006.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.** 20. ed. São Paulo: Manole, 2008.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.

INSTITUT PASTEUR. **Les candidoses**. Setembro 2011. Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/candidoses>>. Acesso em: 05/01/2012.

ISHOLA, I. O.; AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Cnestis ferruginea* Vahl ex DC (Connaraceae) methanolic root extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, p.55-62, 2011.

ISHOLA, I. O. *et al.* Bioactivity guided isolation of analgesic and anti-inflammatory constituents of *Cnestis ferruginea* Vahl ex DC(Connaraceae) root. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p.383-389, 2012.

JI, R.R., WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiology of Disease**, v.8, p.1-10, 2001.

JOLY, A. B. **Botânica, introdução à taxonomia vegetal**. 7.ed. São Paulo: Editora Nacional, 1985.

KALEGARI, M. *et al.* Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.3, p.635-642, 2011.

KALEGARI, M. *et al.* Antibacterial, allelopathic and antioxidant activity of extracts and compounds from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.2, n.9, p.61-66, 2012.

KRAICHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.46, n.3, p.199-206, 2006.

LANIS, A. B. *et al.* Avaliação Laboratorial das Doenças Renais em Pequenos Animais. **Pubvet**, v.2, p.28, 2008.

LAPA, A. J. *et al.* **Plantas medicinais. Métodos de avaliação da atividade farmacológica**. Campinas: Editora Unifesp, 2008.

LEE, S. *et al.* Antiinflammatory activity of hyperin from *Acanthopanax chiisanensis* roots. **Archives of Pharmacal Research**, v.27, n.6, p.628-632, 2004.

LEE, H. J. *et al.* In vitro anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Cinnamomum camphora* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.208-216, 2006.

LEE, D.-Y. *et al.* Isolation of Flavonoids from the Fruits of *Cornus kousa* Burg, **Journal of Applied Biological Chemistry**, v.50, n.3, p.144-147, 2007.

LENZA, E. *et al.* Biologia reprodutiva de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae), uma espécie heterostílica de cerrado do Brasil Central. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.31, n.3, p.389-398, 2008.

LIMA, E. S.; ABDALLA, S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

LIN, L-C.; YANG, L-L.; CHOU, C-J. Constituents from the stems of *Ecdysanthera rosea*. **Journal of Chinese Medicine**, v.13, n.4, p.191-195, 2002.

LONGHI-BALBINOT, D. T. *et al.* Anti-inflammatory effect of triterpene 3 β , 6 β , 16 β - trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p.59-64, 2012.

LOPES, G. C. *et al.* Condensed Tannins from the Bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae) **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.20, n.6, p.1103-1109, 2009.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática**: Guia Ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

LOZANO, V. F. **Avaliação da atividade antiparasitaria e efeito sinérgico de compostos cumarinicos comparados ao benzonidazol em duas cepas de *Trypanossoma cruzi***. 117f. Dissertação (Mestrado Profissional em Farmacia) - Universidade Bandeirantes de São Paulo, São Paulo, 2011.

LUCENA, G. M. R. S. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.19-25, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.4, n.5, p.839-843, 2008.

MARTINS, N. M. B. **Alterações histológicas causadas por nanotubos de carbono de paredes múltiplas em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Nanociências) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2011.

MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; TAKEDA, Y. Structural revisions of blumenol C glucoside and byzantonoside B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.58, n.3, p.438-441, 2010.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MECHIKOVA, G. Y. A. *et al.* Flavonoids from *Vaccinium axillare* leaves. **Chemistry of Natural Products**, v.44, n.1, p.100-101, 2008.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR. Curitiba, 2003.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.1-164, 1999.

MORETTI, M. L. A importância crescente das infecções fúngicas. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.9, n.2, p.8-9, 2007.

MORI, K. Synthesis of optically active grasshopper ketone and dehydrovomifoliol as a synthetic support for the revised absolute configuration of (+)-abscisic acid. **Tetrahedron**, v.30, p.1065-1072, 1974.

NAKAMURA, C. V. *et al.* Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.61-66, 2006.

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos**. Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). Wayne, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras**. Norma Aprovada, 2 ed. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-5623 -469-4). Wayne, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da susceptibilidade de bactérias aeróbicas**. Norma aprovada, 8 ed. Norma M07-A8 do NCCLS (ISBN 1-56238-689-1). Wayne, Pennsylvania, Estados Unidos, 2009.

NOMIZU, K. *et al.* Antioxidants from steamed used tea leaves and their reaction behavior, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.72, n.7, p.1682–1689, 2008.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. **Guideline for testing of chemicals, acute oral toxicity – Acute toxic class method**. 17.ed. 2001.

OLIVEIRA, M. F. *et al.* Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.37, n.3, p.209-228, 2008.

OLIVEIRA, P. V.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Chemical constituents of *Rourea doniana*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.2, p.451-454, 2012.

OLIVEIRA, P. V. *et al.* Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.107, p.403-407, 2010.

OLSON, K. R. *et al.* **Manual de toxicologia clínica**. 6 ed. McGraw-Hill Education, Ed. Artmed. São Paulo, 2014.

O'NEILL, I. D. Continued misrepresentation of KB cells as being of oral cancer phenotype requires action. **Oral Oncology**, v. 45, n.10, p.117-118, 2009.

OSORIO, C.; DUQUE, C.; FUJIMOTO, Y. C₁₃-norisoprenoid glucoconjugates from Lulo (*Solanum quitoense* L.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1641-1645, 1999.

OSÓRIO, E. *et al.* Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.3, p.630-635, 2007.

OTSUKA, H. *et al.* Alangionosides G-M: glicosides of megastigmane derivates from the leaves of *Alangium premnifolium*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.43, n.5, p.754-759, 1995.

OZÇELİK, B. *et al.* Antimicrobial activity of flavonoids against extended-spectrum β -lactamase (ES β L)-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.7, n.4, p.1151-1157, 2008.

PALANIVEL, M. G. *et al.* Hepatoprotective and Antioxidant Effect of *Pisonia aculeata* L. against CCl₄- Induced Hepatic Damage in Rats. **Scientia Pharmaceutica**, v.76; p.203–215, 2008.

PARHAM, P. Elementos do Sistema Imune e seu Papel na Defesa. In: O SISTEMA Imune. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001. Cap. 1.

PISTELLI, L. *et al.* Triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from *Bupleurum falcatum* subsp. Cernuum. **Phytochemistry**, v.33, n.6, p.1537-1539, 1993.

PRABU, G. R.; GNANAMANI, A.; SADULLA, S. Guaijaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.487-495, 2006.

PROMEGA CORPORATION. **Griess reagent system, instruction for use of product G2930**. Promega Technical Bulletin, Estados Unidos, 2009.

PUNZÓN, C.; ALCAIDE, A.; FRESNO, M. In vitro anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. **International Immunopharmacology**, v.3, p.1293-1299, 2003.

QIU, L. *et al.* Two new megastigmane glycosides, physanosides A and B, from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*, and their effect on NO release in macrophages. **Chemistry & Biodiversity**, v.5, p.758-763, 2008.

REGUERA, R. M.; TEKWANI, B. L.; BALAÑA-FOUCE, R. Polyamine transport in parasites: A potential target for new antiparasitic drug development. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 140, p.151–164, 2005.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, p.581-596, 2007.

REVEAL, J. L.; CHASE, M. W. APG III: Bibliographical information and synonymy of Magnoliidae. **Phytotaxa**, v.19, p.71-134, 2011.

RODRIGUES, A. L. *et al.* Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Science**, v. 70, p.1347-1358, 2002.

ROFF, C. F. *et al.* Protein variability in male and female Wistar rat liver proteins. **Journal of Biology Chemistry**, v.267, p.15902-15908, 1992.

ROUREA induta, 2011. Disponível em: <timblindim.wordpress.com/.../14/rourea-induta/>. Acesso em: 27/03/2011.

SAITO, A. *et al.* Systematic synthesis of four epicatechin series procyanidin trimers and their inhibitory activity on the Maillard reaction and antioxidant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p.4783-4790, 2004.

SAKAR, M. K. *et al.* Polyphenolic compounds and antimicrobial activity of *Quercus aucheri*. **Leaves Turkish Journal of Chemistry**, v.29, p.555-559, 2005.

SÁNCHEZ-REUS, M. I. *et al.* Standardized *Hypericum perforatum* reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenone-exposed rats. **Neuropharmacology**, v.52, p.606-616, 2007.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinins receptor subtypes on formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v.31, p.381-389, 1997.

SANTOS, A. R. S. *et al.* Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. **Planta Medica**, v.65, n.1, p.50-55, 1999a.

SANTOS, A. R. S. *et al.* Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobediol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.289, p.4417-4426, 1999b.

SANTOS, M. D. *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.11, p.2236-2240, 2006.

SCHLIEMANN, W.; AMMER, C.; STRACK, D. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. **Phytochemistry**, v.69, p.112-146, 2008.

SHARMA, A. *et al.* Antibacterial activity of medicinal plants against pathogens causing complicated urinary tract infections. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, n. 2, p. 136-139, 2009.

SHOJI, T. *et al.* Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3806-3813, 2003.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.

SIEUWERTS, A. M. *et al.* The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for assessment of growth characteristics, IC50 values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.33, p.813-823, 1995.

SILVA, A. S. G. **Avaliação dos compostos voláteis e fenólicos ao longo da vinificação**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Ramo Alimentar) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro - Portugal, 2012.

SILVA, C. A. N.; BRAGA, S. F. P.; SILVA, A. G. **Urucum, *Bixa orellana* L. (Bixaceae)** – um agente importante na regulação de dislipidemias. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>. Acesso em: 02/06/2012.

SILVA, E. J. R. *et al.* Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L, sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.88-93, 2005.

SILVA, R. R. *et al.* Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, v.35, p.127-133, 2002.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 6ed., 2007.

SIQUEIRA, E. P. *et al.* Leishmanicidal activities of the extract from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p.416-421, 2010.

SMOLAREK, F. S. F. **Contribuição ao estudo fitoquímico, toxicológico e das atividades biológicas da espécie vegetal *Solidago microglossa* DC (Compositae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.2, p.139-149, 2004.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.5, p.329-337, 2007.

SOHN, Y. M. *et al.* Terpenoid constituents from the aerial parts of *Asplenium scolopendrium*. **Natural Products Sciences**, v.14, n.4, p.265-268, 2008.

SOMMER C., KRESS M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: Peripheral mechanisms in inflammatory and neurophatic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**, v. 361, p.184-187, 2004.

SOORY, M. Relevance of nutritional antioxidants in metabolic syndrome, ageing and cancer: potential for therapeutic targeting. **Infectious Disorders Drug Targets**, v.9, p.400-414, 2009.

STIEN, D. *et al.* Total synthesis of the antitumor marine sponge alkaloid agelastatin A. **Journal of American Chemical Society**, v.121, n.41, p.9574-9579, 1999.

SOUZA, W. **Doenças Negligenciadas**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 56 p., 2010.

TAI, K-W. *et al.* Cytotoxic effect of pingyangmycin on cultured KB cells. **Oral Oncology**, v.34, p.219-223, 1998.

TAKEDA, Y. *et al.* Megastigmane glucosides from *Stachys byzantina*. **Phytochemistry**, v.44, n.7, p.1335-1337, 1997.

TEMPÊTE, C. *et al.* In vitro cytostatic activity of 9-demethoxyporothramycin B. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.30, p.647-650, 1995.

THE PLANT LIST: A working list of all plant species. Disponível em: <www.theplantlist.org>. Acesso em: 20/10/2011.

TJØLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.

TORRES, S. M. *et al.* **Avaliação histopatológica do ensaio toxicológico da 2-N-glicina-1,4-naftoquinona sobre fígado e rins de camundongos Swiss**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

UMEHARA, K. *et al.* Studies on the constituents of leaves of *Citrus unshiu* Marcov. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.36, p.5004-5008, 1988.

VOLP, A. C. P. *et al.* Flavonoides Antocianinas: Características e Propriedades na Nutrição e Saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v.23, n.2, p.141-149, 2008.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants**: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>>. Acesso em: 01/07/ 2007.

WEN, C-L. *et al.* Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Antrodia cinnamomea* mycelia both *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.575-584, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas disease**. Technical report series Geneva, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases. Chagas disease (American tripanossomiase)**. Disponivel em : <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html>. Acesso em: 05/12/2011.

XIANG, M. *et al.* Isolation, identification and determination of methyl caffeate, ethyl caffeate and other phenolic compounds from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*, **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n.9, p. 1685-1691, 2011.

XIANG, T. *et al.* Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei*. **Planta Medica**, v.67, p.322-325, 2001.

YAGI K. Assay for serum lipid peroxide level by TBA reaction. In: YAGI K. (ed). **Lipid peroxides in biology and medicine**. New York: Academic Press, 1982. p.223-242

YAJIMA, A., *et al.* A simple synthesis of four stereoisomers of roseoside and their inhibitory activity on leukotriene release from mice bone marrow-derived cultured mast cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, n.1, p.189-197, 2009.

YAMANO, Y.; ITO, M. Synthesis of optically active vomifoliol and roseoside stereoisomers. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.53, n.5, p.541-546, 2005.

YANG, E-J. *et al.* Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts. **Interdisciplinary Toxicology**, v.2, n.4, p.245-249, 2009.

YERIMA, M. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of the methanolic leaves extract os *Securinega visora* (Euphorbiaceae). **Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.8, n.1, p.47-53, 2009.

ZHU, X. *et al.* Phenolic compounds from *Viburnum cylindricum*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, p.339-342, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

**AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO
GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35,
DE 27 DE ABRIL DE 2011
Nº 03/2014**

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, as **atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, relatório anual sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

Volney Zanardi Junior
Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.

ANEXO 2 – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEa)



Nº 535

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEa, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEa, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEa internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.070532/2011-05

APROVADO: 03/05/2011 – R.O. 04/2011

TÍTULO: Triagem farmacológica de dor e inflamação de *Rourea induta* Planch, Connaraceae; *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek Acanthacea e *Byrsonima duckeana* Malpighiaceae

AUTORES: Obdulio Gomes Miguel, Milena Kalegari, Maria Cristina dos Santos Verdam, Adair Roberto Soares dos Santos

DEPARTAMENTO: Farmacologia

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEEa

ANEXO 3 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA PUC-PR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

PUCPR

Curitiba, 12 de maio de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 594 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da toxicidade aguda dos extratos aquoso e hidroalcolólico da espécie *Rourea induta* Planch

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Patrícia Maria Stuelp Campelo

EQUIPE DE PESQUISA:

Patrícia Maria Stuelp Campelo, Camila Rosalina Nogueira, Priscila Aliberti Beraldo

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS / Graduação em Biotecnologia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Camundongos (<i>mus musculus</i>)	Machos e fêmeas	60 dias 25-30g	C	70

O colegiado do CEUA em reunião no dia 12/05/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO.**

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser



ANEXO 4 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFRN

**Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

PROTOCOLO N.º 029/2011

Professor/Pesquisador: *MARIA DAS GRAÇAS ALMEIDA*

Natal (RN), 16 de novembro de 2011.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto “AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DE PLANTAS NATIVAS DO SEMI-ÁRIDO: BUSCA DE NOVAS BIOMOLÉCULAS ATIVAS”, **protocolo nº 029/2011**, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório: **NOVEMBRO 2013**
- Relatório Final: **NOVEMBRO 2015** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,


Elaine C. Gavioli
Coordenadora da CEUA

ANEXO 5 – ACEITE DE ARTIGO

Accepted Manuscript

Chemical composition, antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) against CCl₄-induced liver injury in female rats

Milena Kalegari, MSc. Carlos Alberto Bruel Gemin, MSc. Gabriel Araújo-Silva, MSc. Naira Josele Neves de Brito, Ph.D. Jorge A. López, Ph.D. Sibeles de Oliveira Tozetto, Ph.D. Maria das Graças Almeida, Ph.D. Marilis Dallarmi Miguel, Ph.D. Didier Stien, Ph.D. Obdulio Gomes Miguel, Ph.D.

PII: S0899-9007(13)00506-6

DOI: [10.1016/j.nut.2013.11.004](https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.11.004)

Reference: NUT 9157

To appear in: *Nutrition*

Received Date: 28 June 2013

Revised Date: 12 November 2013

Accepted Date: 13 November 2013

Please cite this article as: Kalegari M, Bruel Gemin CA, Araújo-Silva G, Neves de Brito NJ, López JA, de Oliveira Tozetto S, Almeida MdG, Miguel MD, Stien D, Miguel OG, Chemical composition, antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) against CCl₄-induced liver injury in female rats, *Nutrition* (2013), doi: 10.1016/j.nut.2013.11.004.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

